



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



**Envolvimento da neurotransmissão nitrérgica no hipocampo  
dorsal no controle da função cardiovascular e das respostas  
autônomas e comportamentais ao estresse social crônico**

**Jeferson de Almeida**

**São Carlos-SP**

**2018**



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



**Envolvimento da neurotransmissão nitrérgica no hipocampo dorsal no controle da função cardiovascular e das respostas autônomas e comportamentais ao estresse social crônico**

**Jeferson de Almeida**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) UFSCar/UNESP, como requisito para obtenção do **Título de Doutor em Ciências Fisiológicas**, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani.

**São Carlos-SP**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

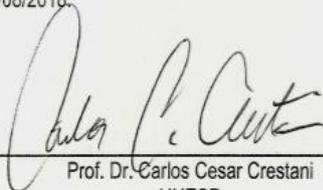
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

**Folha de Aprovação**

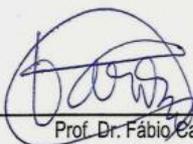
---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Jeferson de Almeida, realizada em 17/08/2018:



---

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani  
UNESP



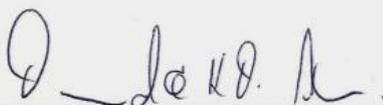
---

Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz  
UNIFESP



---

Prof. Dr. Jose Vanderlei Menani  
UNESP



---

Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves  
UFLA



---

Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin  
UNESP

## **DEDICATÓRIA**

Eu dedico esse trabalho primeiramente a Deus que iluminou o meu caminho durante essa caminhada.

Aos meus pais, irmãos, minha esposa Michele, minha filha Sophia e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, sempre me deram forças nos momentos mais difíceis em que eu passei e não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente agradeço a Deus pela oportunidade de uma vida abundante. Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado acreditando em meu sucesso profissional.

À minha esposa Michele por ter acreditado em meu potencial e compreendido a minha ausência em alguns momentos importantes de nossa vida e sempre que pode me deu novas energias e “acendeu muitas luzes no fim do túnel”.

Agradeço de coração aos meus irmãos, que sempre me deram força para continuar mais e mais, e sempre ser um vencedor convicto.

Ao professor Carlos Cesar Crestani, que dedicou horas e horas de seu precioso tempo para orientar-me a construir esse trabalho.

Aos professores do curso, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos meus colegas de laboratório Leandro, Ricardo, Josiane, Jonas, Ana Cláudia, Lígia, Matheus, Paula, Lucas Barreto e Lucas Gomes entre outros.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas, UFSCar e UNESP pela oportunidade de participar e contribuir para esse excelente programa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação, pela disponibilidade, atendimento e orientações.

Às técnicas do laboratório Elisabete Z.P. Lepera e Rosana F.P. Silva por serem fundamentais e imprescindíveis nessa conquista.

E a todas as pessoas, que apesar de não estarem citadas aqui, estiveram presentes e me auxiliando na realização deste trabalho.

## EPÍGRAFE

### *My Way*

And now the end is near, and so I face the final curtain. My friend, I'll say it clear,  
I'll state my case, of which I'm certain.

I've lived a life that's full, I travelled each and every highway. And more, much  
more than this, I did it my way.

Regrets I've had a few, but then again too few to mention. I did what I had to do,  
and saw it through without exemption.

I planned each chartered course. Each careful step along the by way. And more,  
much more than this,  
I did it my way.

Yes, There were times, I'm sure you knew, when I bit off more than I could chew.  
But through it all, when there was doubt, I ate it up, and spit it out. I faced it all,  
and I stood tall, and did it my way.

I've loved, I've laughed, and cried, I've had my fill, my share of losing. And now, as  
tears subside, I find it all so amusing.

To think I did all that, and may I say, not in a shy way. Oh no, oh no, not me I did  
it my way.

For what is a man, what has he got, If not himself, then he has not To say the  
things he truly feels, and not the words of one who kneels.

The record shows, I took the blows and did it my way. Yes, it was my way.

*Compositor: Paul Anka / Jacques Reveaux / Claude François*

# SUMÁRIO

<b>1) INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1.</b> Hipocampo dorsal e a atividade barorreflexa: nNOS, iNOS e eNOS.....	18
<b>1.2.</b> Estresse crônico social e a associação entre depressão/ansiedade e complicações cardiovasculares.....	20
<b>1.3.</b> Óxido nítrico: depressão, ansiedade e função cardiovascular.....	22
<b>1.4.</b> Hipocampo dorsal e nNOS: depressão, ansiedade e respostas cardiovasculares ao estresse.....	24
<b>2) OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3) MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
<b>3.1.</b> Animais.....	28
<b>3.2.</b> Isolamento social.....	28
<b>3.3.</b> Implante de cânulas guias no hipocampo dorsal.....	28
<b>3.4.</b> Canulação da artéria e veia femorais.....	29
<b>3.5.</b> Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	30
<b>3.6.</b> Registro da temperatura cutânea da cauda.....	30
<b>3.7.</b> Avaliação da atividade barorreflexa.....	30
<b>3.8.</b> Estresse por restrição aguda.....	31
<b>3.9.</b> Teste de nado forçado.....	31
<b>3.10.</b> Teste do labirinto em cruz elevado.....	31
<b>3.11.</b> Quantificação da expressão da nNOS e da nitrotirosina no hipocampo dorsal.....	32
<b>3.11.1.</b> Microdissecção do hipocampo dorsal.....	32
<b>3.11.2.</b> Quantificação dos níveis proteicos da nNOS e da nitrotirosina no hipocampo dorsal.....	32
<b>3.12.</b> Microinjeção de drogas no hipocampo dorsal.....	33
<b>3.13.</b> Determinação anatômica dos sítios de injeção no encéfalo.....	33
<b>3.14.</b> Drogas e Soluções.....	33

3.15. Análises estatísticas.....	34
<b>4) PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>35</b>
4.1. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações na atividade barorreflexa.....	35
4.2. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações cardiovasculares induzidas pelo isolamento social.....	36
4.3. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição aguda induzida pelo isolamento social.....	37
4.4. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações comportamentais induzidas pelo estresse de isolamento social.....	38
4.5. Estudo do efeito do estresse de isolamento social sobre a expressão de nNOS e nitrotirosina no hipocampo dorsal.....	39
<b>5) RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
5.1. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações na atividade barorreflexa.....	41
5.1.1. Efeitos do tratamento do hipocampo dorsal com o veículo na função barorreflexa em ratos não anestesiados.....	42
5.1.2. Efeitos do tratamento hipocampo dorsal com carboxy-PTIO na função barorreflexa em ratos não anestesiados.....	42
5.1.3. Efeitos do tratamento do hipocampo dorsal com o NPLA na função barorreflexa em ratos não anestesiados.....	44
5.1.4. Efeitos do tratamento hipocampo dorsal com 1400W na função barorreflexa em ratos não anestesiados.....	46
5.1.5. Efeitos do tratamento do hipocampo dorsal com L-NAME na função barorreflexa em ratos não anestesiados co-tratados localmente com NPLA + 1400W.....	48
5.2. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações cardiovasculares e comportamentais induzidas pelo isolamento social.....	50
5.2.1. Efeitos do estresse de isolamento social sobre o ganho de peso corporal.....	50
5.2.2. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações comportamentais induzidas pelo isolamento social.....	51

5.2.3. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações cardiovasculares induzidas pelo isolamento social.....	55
5.2.4. Efeito do estresse de isolamento social na expressão da nNOS e dos níveis de nitrotirosina no hipocampo dorsal.....	61
<b>6) DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
6.1. Neurotransmissão nitrérgica no hipocampo dorsal e a atividade do barorreflexo.....	64
6.2. Neurotransmissão nitrérgica no hipocampo dorsal e as respostas comportamentais e cardiovasculares ao isolamento social.....	67
<b>7) CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Protocolo experimental das respostas cardiovasculares e ao estresse por restrição agudo.....	37
<b>Figura 2.</b> Protocolo experimental das alterações comportamentais.....	39
<b>Figura 3.</b> Protocolo experimental da expressão de nNOS e dos níveis nitrotirosina.....	40
<b>Figura 4.</b> Microfotografia de uma secção coronal do hipocampo dorsal dos animais do protocolo cardiovascular do barorreflexo.....	41
<b>Figura 5.</b> Análise de regressão linear da função barorreflexa dos animais tratados com carboxy-PTIO.....	43
<b>Figura 6.</b> Análise de regressão linear da função barorreflexa dos animais tratados com NPLA.....	45
<b>Figura 7.</b> Análise de regressão linear da função barorreflexa dos animais tratados com 1400W.....	47
<b>Figura 8.</b> Análise de regressão linear da função barorreflexa dos animais tratados com L-NAME.....	49
<b>Figura 9.</b> Curva temporal de peso corporal.....	50
<b>Figura 10.</b> Microfotografia de uma secção coronal do hipocampo dorsal dos animais do protocolo comportamental.....	51
<b>Figura 11.</b> Tempo de imobilidade no teste de natação forçada.....	53
<b>Figura 12.</b> Parâmetros analisados no teste do labirinto de cruz elevado.....	54
<b>Figura 13.</b> Microfotografia de uma secção coronal do hipocampo dorsal dos animais do protocolo das alterações cardiovasculares induzidas pelo isolamento social.....	55
<b>Figura 14.</b> A FC, PAM, PAS e PAD nos grupos controle e isolados tratados com veículo, NPLA e carboxy-PTIO.....	58
<b>Figura 15.</b> Curvas de evolução temporal da pressão arterial média, frequência cardíaca e temperatura da cauda evocada pelo estresse agudo de restrição.....	60
<b>Figura 16.</b> Expressão da nNOS e dos níveis de nitrotirosina no hipocampo dorsal.....	61

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Resumo do papel da nNOS, iNOS e eNOS no HD.....	63
--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

Ca<sup>+2</sup> – Cálcio

CAPON – Ligante PDZ carboxi-terminal da proteína neuronal óxido nítrico sintase

CART – Transcritos relacionados à anfetamina e cocaína

CoCl<sub>2</sub> – Cloreto de cobalto

c-PTIO – Sequestrador de óxido nítrico

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

EPM – Erro padrão da média

FC – Frequência cardíaca

G – Ganho

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GABA<sub>A</sub> – Receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub>

GCs – Guanilato ciclase solúvel

GMPc – Guanosina monofosfato cíclico

GTP – Guanosina trifosfato

HD – Hipocampo dorsal

IML – Coluna celular intermediolateral

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

L-NAME – Inibidor não-seletivo do óxido nítrico sintetase

mPOA – Área pré-óptica medial

NaCl – Cloreto de sódio

NLET – Núcleo do leito estria terminal

NMDA – Receptor N-metil D-Aspartato

nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

NPLA – Inibidor seletivo do óxido nítrico sintase neuronal

NPS – Nitroprussiato de sódio doador de óxido nítrico

NTS – Núcleo do trato solitário

ODQ – Inibidor específico da guanilato ciclase solúvel

PAD – Pressão arterial diastólica

PAM – Pressão arterial média

PAS – Pressão arterial sistólica

PBS – Tampão fosfato salina

PSD95 – Proteína de densidade pós-sináptica 95

P2Y – Receptor purinérgico

RVLM – Bulbo ventrolateral rostral

1400W – Inibidor seletivo da iNOS

5-HT<sub>1A</sub> – Receptores de serotonina inibitório

5-HT<sub>1B</sub> – Receptores de serotonina

7-NI – 7-nitroindazole

$\Delta$ FC – Delta de frequência cardíaca

$\Delta$ PAM – Delta da pressão arterial média

## RESUMO

O hipocampo é parte do sistema límbico, e está diretamente envolvido em processos cognitivos, em comportamentos defensivos relacionados à ansiedade, nas respostas ao estresse e na neurobiologia da depressão. Alguns estudos tem também reportado um papel do hipocampo no controle da função cardiovascular. Entretanto, os mecanismos neuroquímicos envolvidos no controle das respostas comportamentais e da função cardiovascular pelo hipocampo ainda são pouco compreendidos. O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir de L-arginina por três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que são denominadas neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS). Assim, uma das hipóteses investigadas no presente estudo foi a de que aumento na formação de NO a partir da nNOS no hipocampo dorsal esteja envolvido nas alterações cardiovasculares e comportamentais induzidas pelo isolamento social. Uma segunda hipótese investigada no presente estudo foi a de que tanto a nNOS, iNOS e eNOS no hipocampo dorsal estão envolvidas no controle das respostas cardíacas do barorreflexo. Nós identificamos que o estresse de isolamento social promoveu alterações comportamentais do tipo depressivas e ansiogênicas, e o tratamento do hipocampo dorsal com NPLA (inibidor seletivo da nNOS) ou carboxy-PTIO (sequestrador de NO) reverteu o efeito comportamental do tipo depressivo. O isolamento social não alterou as respostas de aumento da pressão arterial e frequência cardíaca e queda da temperatura cutânea induzidas pelo estresse de restrição. Entretanto, o tratamento do hipocampo dorsal com NPLA aumentou as respostas pressora e taquicárdica e reduziu a queda da temperatura da cauda induzidas pelo estresse de restrição nos animais isolados, mas não nos animais controle. O isolamento social aumentou os níveis de nitrotirosina no hipocampo dorsal, e uma tendência de aumento nos níveis de nNOS foi identificado. Com relação às respostas cardíacas do barorreflexo, nós observamos que o tratamento do hipocampo dorsal com carboxy-PTIO diminuiu a taquicardia decorrente de queda da pressão arterial. A microinjeção de NPLA aumentou a bradicardia para aumento da pressão arterial, ao passo que o 1400W (inibidor seletivo iNOS) diminuiu a taquicardia reflexa e aumentou a bradicardia reflexa. Além disso, a administração de L-NAME (inibidor não-seletivo da NOS) em animais co-tratados com NPLA+1400W (para inibir nNOS e iNOS) reduziu a bradicardia reflexa. Baseado nesses resultados, nós concluímos que a neurotransmissão nitrérgica no hipocampo dorsal modula as respostas

cardíacas do barorreflexo, e esse controle é específico da nNOS, iNOS e eNOS. Além disso, o isolamento social aumenta a liberação de NO no hipocampo dorsal, possivelmente por aumento na expressão da nNOS, e este efeito está relacionado com as respostas comportamentais do tipo ansioso e depressivo desencadeados pelo isolamento social. Além disso, este aumento na formação local de NO a partir da nNOS desempenha um papel inibitório nas respostas de aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, além de facilitar a vasoconstrição cutânea mediada pelo simpático durante o estresse de restrição.

**Palavras-chave:** nNOS, óxido nítrico, estresse de isolamento social, hipocampo dorsal, barorreflexo.

## ABSTRACT

The hippocampus is part of the limbic system, and is directly involved in cognitive processes, anxiety-related defensive behaviors, stress responses, and the neurobiology of depression. Some studies have also reported a role of the hippocampus in the control of cardiovascular function. However, the neurochemical mechanisms involved in the control of behavioral responses and cardiovascular function within the hippocampus are still poorly understood. Nitric oxide (NO) is synthesized from L-arginine by three isoforms of the enzyme nitric oxide synthase (NOS), which are called neuronal (nNOS), endothelial (eNOS) and inducible (iNOS). Thus, one of the hypotheses investigated in the present study was that alterations in the formation of NO from nNOS into the dorsal hippocampus are involved in the cardiovascular and behavioral changes induced by social isolation. A second hypothesis investigated in the present study was that both nNOS, iNOS and eNOS in the dorsal hippocampus are involved in the control of cardiac responses of the baroreflex. We identified that social isolation increased depressive- and anxiety-like behaviors, and the treatment of the dorsal hippocampus with NPLA (selective nNOS inhibitor) or carboxy-PTIO (NO scavenger) reversed the behavioral effect of depressive type. Social isolation did not alter the blood pressure and heart rate increase and the drop in tail skin temperature evoked by restraint stress. However, treatment of the dorsal hippocampus with NPLA increased restraint-evoked pressor and tachycardic responses and decreased tail temperature in isolated, but not control, animals. Social isolation increased levels of nitrotyrosine in the dorsal hippocampus, and a trend of increased nNOS levels was identified. Regarding the cardiac responses of the baroreflex, we observed that treatment of the dorsal hippocampus with carboxy-PTIO decreased the tachycardia to drop in blood pressure. Microinjection of NPLA increased bradycardia to increase in blood pressure, whereas 1400W (selective iNOS inhibitor) decreased reflex tachycardia and increased reflex bradycardia. In addition, administration of L-NAME (non-selective NOS inhibitor) in animals co-treated with NPLA + 1400W (to inhibit nNOS and iNOS) decreased reflex bradycardia. Based on these results, we conclude that nitrergic neurotransmission in the dorsal hippocampus modulates cardiac responses of the baroreflex, and this control is specific to nNOS, iNOS and eNOS. In addition, social isolation increases the release of NO in the dorsal hippocampus, possibly by increasing nNOS expression, and this effect

is related to the anxiogenic- and depressive-like behavioral responses evoked by social isolation. Furthermore, this increase in the local formation of NO from nNOS plays an inhibitory role in the increase of arterial pressure and heart rate, in addition to facilitating the sympathetic-mediated vasoconstriction during restraint stress.

**Keywords:** nNOS, nitric oxide, social isolation stress, dorsal hippocampus, baroreflex.

## 1. INTRODUÇÃO

O hipocampo é parte do sistema límbico e está diretamente envolvido em processos cognitivos, em comportamentos defensivos relacionados à ansiedade, nas respostas ao estresse e na neurobiologia da depressão (Engin e Treit, 2007; Joca et al., 2007; Ulrich-Lai e Herman, 2009; Eisch e Petrik, 2012). Evidências comportamentais, neuroanatômicas e moleculares tem sugerido que o hipocampo pode ser subdividido em duas regiões: a zona rostro/dorsal (hipocampo dorsal) e caudo/ventral (hipocampo ventral) (Moser e Moser, 1998; Fanselow e Dong, 2011). Tem sido proposto que o hipocampo dorsal estaria envolvido primariamente com funções cognitivas, enquanto o hipocampo ventral estaria mais relacionado com a regulação das respostas ao estresse, da emoção e do afeto (Moser e Moser, 1998; Fanselow e Dong, 2011). Esta hipótese tem sido suportada por evidências de que a lesão/inibição do hipocampo dorsal, porém não do hipocampo ventral, causa prejuízo em testes comportamentais cognitivos; ao passo que a lesão do hipocampo ventral, porém não do hipocampo dorsal, reduz as respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse e induz alterações comportamentais do tipo ansiolíticas (Bannerman et al., 2002; Kjelstrup et al., 2002; Bertoglio et al., 2006; Kheirbek et al., 2013). Entretanto, alguns resultados controversos têm sido reportados com relação a esta subdivisão do hipocampo. Por exemplo, estudos tem reportado um envolvimento do hipocampo ventral em processos cognitivos (Ferbinteanu et al., 2003; Loureiro et al., 2012). Além disso, a microinjeção de midazolam (benzodiazepínico) ou fluoxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina) no hipocampo dorsal produziu alterações comportamentais do tipo ansiolíticas e antidepressivas, respectivamente (Menard e Treit, 2001; Hiroaki-Sato et al., 2014). A estimulação elétrica ou química do hipocampo dorsal também causou alterações na pressão arterial e frequência cardíaca de ratos (Ruit e Neafsey, 1988). Neste sentido, estudos tem reportado um papel do hipocampo dorsal nas respostas cardiovasculares e comportamentais durante reações de defesa (Resstel et al., 2008a; Scopinho et al., 2013). O hipocampo dorsal também está envolvido em alterações comportamentais relacionadas à depressão e ansiedade induzidas pelo estresse (Padovan et al., 2000; Padovan e Guimarães, 2004; Scopinho et al., 2013).

### **1.1. Hipocampo dorsal e a atividade barorreflexa: nNOS, iNOS e eNOS**

O barorreflexo é um importante mecanismo de regulação momento a momento da pressão arterial (Michelini et al., 2015). Além disso, uma redefinição da função barorreflexa em direção a valores mais elevados de pressão arterial contribui com as respostas autonômicas e cardiovasculares durante o exercício físico e situações de estresse (DiCarlo e Bishop, 2001; Dampney et al., 2008; Michelini et al., 2015; Crestani, 2016). Também, o comprometimento da função do barorreflexo é proposto como mecanismo fisiopatológico de várias doenças cardiovasculares, como a hipertensão (Grassi et al., 2006; Honzikova e Fiser, 2009). Essas evidências indicam um papel relevante do barorreflexo no controle da função cardiovascular durante o repouso e situações de desafio ambiental (por exemplo, estresse e exercício físico), bem como em condições patológicas. Entretanto, apesar da importância do barorreflexo, os mecanismos neurobiológicos envolvidos no controle das respostas do barorreflexo ainda não são completamente compreendidos.

Vários estudos relataram uma influência do hipocampo no controle da função cardiovascular (Ulrich-Lai e Herman, 2009; Dampney, 2016; Myers, 2017). Por exemplo, estudos iniciais relataram que a estimulação elétrica ou química do hipocampo causa alterações cardiovasculares e autonômicas, como diminuição da pressão arterial, frequência cardíaca e atividade nervosa simpática (Akert et al., 1953; Anand et al., 1956a; Anand et al., 1956b; Ruit e Neafsay, 1988). Outros estudos relataram um envolvimento do hipocampo nas respostas cardiovasculares durante ameaças aversivas (Resstel et al., 2008a; Moraes-Neto et al., 2014). Além disso, evidências mais recentes sugeriram um papel do hipocampo dorsal nos mecanismos reflexos cardiovasculares, como o barorreflexo e o quimiorreflexo (Kuntze et al., 2016; Ferreira-Junior et al., 2017). Com relação às respostas barorreflexas, foi observado que a inibição sináptica no hipocampo dorsal através da microinjeção local de cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) aumentou as respostas cardíacas do barorreflexo, ao passo que a inibição sináptica no hipocampo ventral diminuiu essas respostas reflexas (Ferreira-Junior et al., 2017). Avaliação da participação das neurotransmissões glutamatérgica, GABAérgica e endocanabinoide no controle das respostas do barorreflexo pelo hipocampo dorsal revelou que o glutamato no hipocampo facilita a função barorreflexo cardíaco através da atuação nos receptores NMDA e AMPA/Kainate; enquanto os neurotransmissores GABA, atuando nos receptores  $\text{GABA}_A$ , e endocanabinóides, atuando nos receptores  $\text{CB1}$ , reduzem as

respostas cardíacas do barorreflexo. Além disso, foi encontrado uma interação entre as neurotransmissões glutamatérgica e endocanabinóide na HD na modulação da função barorreflexa cardíaca (Ferreira-Junior et al., 2018). Entretanto, um possível envolvimento de outros mecanismos neuroquímicos locais nunca foi investigado.

O óxido nítrico é considerado uma molécula protetora do sistema cardiovascular por meio de suas ações nos vasos sanguíneos e no coração (Lei et al., 2013; Tang et al., 2014). Além disso, ele atua no sistema nervoso central como uma molécula de sinalização e tem sido considerado um neurotransmissor atípico (Prast e Philippu, 2001; Garthwaite, 2008). O NO é sintetizado a partir de L-arginina por três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que são denominadas neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) (Alderton et al., 2001). A nNOS e eNOS são enzimas dependentes do complexo  $\text{Ca}^{+2}$ -calmodulina para formar NO (Forstermann et al., 1995). A nNOS é amplamente expressa no encéfalo de mamíferos (Bredt et al., 1991; Vicent et al., 1992), inclusive no hipocampo (Vicent et al., 1992; Doyle et al., 1997); enquanto a eNOS é predominantemente encontrada no endotélio vascular e miócitos cardíacos (Yuyun et al., 2018). No entanto, NO derivado de eNOS de células endoteliais, e talvez de astrócitos (Lin et al., 2007), tem sido relatado como modulador da atividade sináptica em muitas regiões do sistema nervoso central (Paton et al., 2007; Garthwaite, 2008), incluindo o hipocampo (Hopper et al., 2006). A iNOS é uma enzima independente do complexo  $\text{Ca}^{+2}$ -calmodulina, que geralmente não é expressa sob condições basais (Guix et al., 2005). No entanto, foi relatado que a iNOS é constitutivamente expressa em alguns tecidos, inclusive em várias regiões do cérebro (Amitai, 2010).

Estudos anteriores relataram uma influência da ativação da nNOS no hipocampo no controle da função cardiovascular em condições de repouso. Por exemplo, a administração de L-glu no hipocampo ventral causou respostas pressora e taquicárdica dose-dependente em ratos não-anestesiados, e esses efeitos foram mediados pela ativação de receptores NMDA e nNOS, bem como da síntese de GMPC (Santini et al., 2013). Foi também reportado o envolvimento do receptor glutamatérgico NMDA, NO e GMPC no hipocampo dorsal na modulação da expressão de medo contextual (Fabri et al., 2014). Além disso, o bloqueio dos receptores NMDA, bem como da enzima nNOS, no HD reduzem as respostas pressora, taquicárdica e a queda da temperatura da pele observada durante o estresse de restrição (Moraes-Neto et al.,

2014). No entanto, um possível papel da nNOS hipocampal no controle da função barorreflexa nunca foi relatado. Além disso, apesar da evidência da expressão constitutiva de iNOS e eNOS no hipocampo (Hopper et al., 2006; Montezuma et al., 2012; Pinnock et al., 2007; Adachi et al., 2010; Yoshino et al., 2017), um possível papel dessas isoformas de NOS no controle hipocampal da função cardiovascular ainda é desconhecido. *Assim, uma das hipóteses investigadas no presente estudo foi a de que tanto a nNOS, iNOS e eNOS no hipocampo dorsal estão envolvidas no controle das respostas cardíacas do barorreflexo.*

## **1.2. Estresse crônico social e a associação entre depressão/ansiedade e complicações cardiovascular**

Patologias cardiovasculares e transtornos psiquiátricos estão entre as principais doenças incapacitantes no mundo (Murray et al., 2012; Vos et al., 2012). Independentemente de doenças cardiovasculares e transtornos psiquiátricos representarem problemas individuais de saúde pública, estudos clínicos e pré-clínicos indicam uma extensa comorbidade entre alguns transtornos psiquiátricos e patologias cardiovasculares. Por exemplo, transtornos afetivos 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 (Rozanski et al., 1999; Glassman et al., 2007; Grippo, 2009; Thurston et al., 2013; Carnevali et al., 2014; Hare et al., 2014), assim indicando uma associação bidirecional na comorbidade entre transtornos psiquiátricos e patologias cardiovasculares. A associação entre transtornos afetivos e de ansiedade e complicações cardiovasculares são independentes de fatores de risco cardiovascular tradicionais como dislipidemia, sedentarismo e obesidade (Kubzansky e Kawachi, 2000; Wulsin et al., 2003; Huffman et al., 2010). Apesar da importância do tema, os mecanismos envolvidos na associação entre transtornos psiquiátricos e problemas cardiovasculares ainda são pouco compreendidos. Respostas neuroendócrinas, autonômicas, cardiovasculares, metabólicas e imunológicas são geradas durante a exposição a situações de estresse (Ulrich-Lai e Herman, 2009; Sterling, 2012). Apesar de em curto prazo essas respostas serem adaptativas, a ativação prolongada destas respostas durante a exposição crônica ou repetida a eventos estressores (i.e., estresse crônico) causa alterações morfológicas e funcionais em vários tecidos, nas quais levam ao desencadeamento de patologias (McEwen, 1998; McEwen et al., 2007). Neste sentido, estudos clínicos e pré-clínicos

tem demonstrado que a exposição crônica a eventos estressores tem sido associada com a etiologia de transtornos afetivos e de ansiedade e patologias cardiovasculares (Pittenger e Duman, 2008; Grippo et al., 2009; Faravelli et al., 2012; Steptoe e Kivimäki, 2012; Carnevali et al., 2014).

Adversidades no ambiente social têm sido demonstradas ser um importante fator estressante afetando o comportamento e a função cardiovascular. Por exemplo, um aumento na percepção de solidão e o rompimento de conexões sociais (i.e., isolamento) em humanos estão associados com o surgimento de sintomas de depressão e ansiedade, bem como com o desenvolvimento de complicações cardiovasculares (Rozanski et al., 1999; Steptoe e Kivimäki, 2012; Meltzer et al., 2013). Estudos pré-clínicos também têm demonstrado que períodos de isolamento social estão associados com alterações comportamentais e na função cardiovascular em roedores. Com relação a comportamentos relacionados à depressão, foi demonstrado um aumento no tempo imobilidade no teste de nado forçado e redução no consumo e preferência para sacarose/sacarina (Brenes et al., 2008; Grippo et al., 2008; Fischer et al., 2012; Jahng et al., 2012). O isolamento social também reduziu a exploração dos braços abertos no labirinto em cruz elevado, assim indicando um efeito do tipo ansiogênico (Fone e Porkess, 2008; Grippo et al., 2008; Fischer et al., 2012).

Assim como reportado em estudos clínicos (Rozanski et al., 1999; Steptoe e Kivimäki, 2012), alterações cardiovasculares também tem sido observadas em roedores após um período de isolamento social. Neste sentido, hipertensão, arritmia e hipertrofia cardíaca e aórtica; bem como alterações no balanço autonômico cardíaco, na atividade barorreflexa, na reatividade vascular a agentes vasoativos e na responsividade cardiovascular a estímulos aversivos têm sido reportados (Gamallo et al., 1986; Carlier et al., 1988; Gardiner e Bennett, 1993; Maslova et al., 2010; Grippo et al., 2007; Peuler et al., 2012; Cruz et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que o isolamento social exacerbou as respostas autonômicas, inflamatórias e comportamentais observadas em um modelo experimental de parada cardíaca/ressuscitação (Norman et al., 2010). Os efeitos cardiovasculares do isolamento social são consistentes com as alterações cardiovasculares observadas na depressão e ansiedade em humanos (Rozanski et al., 1999; Grippo, 2011; Thurston et al., 2013; Hare et al., 2014). Além disso, foi reportada uma correlação significativa entre as respostas cardiovasculares e as alterações comportamentais induzidas pelo isolamento social em roedores (Grippo et al., 2007;

Grippo et al., 2011). Deste modo, o isolamento social tem sido descrito como um modelo experimental com validade etológica para o estudo da associação entre alterações comportamentais e complicações cardiovasculares (Grippo, 2011; Sgoifo et al., 2014).

### **1.3. Óxido nítrico: depressão, ansiedade e função cardiovascular**

Como mencionado acima, o NO age no sistema nervoso central como uma molécula de sinalização, e é considerado um neurotransmissor atípico (Prast e Philippu, 2001; Garthwaite, 2008). Garthwaite e colaboradores (1988) demonstraram que a ativação de receptores glutamatérgico NMDA em neurônios pós-sinápticos resulta na formação de NO, através de um mecanismo dependente de  $Ca^{+2}$ . Deste modo, uma das formas de síntese de NO no sistema nervoso central envolve a ativação de receptores NMDA e conseqüentemente aumenta nas concentrações intracelulares de  $Ca^{+2}$ , o que acarreta a ativação da nNOS (Garthwaite, 2008). O NO possui diversas vias de sinalização, sendo que a principal envolve a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel, que converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Garthwaite, 2008). O NO se difunde rapidamente e modula, principalmente através de mecanismos dependente de GMPc, a função neuronal e a liberação de neurotransmissores em numerosas regiões no sistema nervoso central (Prast e Philippu, 2001; Garthwaite, 2008).

Estudos clínicos demonstraram que pacientes deprimidos apresentaram aumento nos níveis séricos de metabólitos do NO e aumento na expressão da nNOS no encéfalo (Suzuki et al., 2001; Bun-Hee et al., 2006; Oliveira et al., 2008). Neste sentido, dados pré-clínicos tem demonstrado que o tratamento sistêmico com inibidores da síntese de NO reduziu o tempo de imobilidade no teste de nado forçado em ratos (Jeferys e Funder, 1996). Este efeito parece ser devido à inibição da isoforma nNOS, uma vez que o tratamento sistêmico com inibidores mais seletivos para esta isoforma também induziu efeito do tipo antidepressivo no teste de nado forçado (Yldiz et al., 2000; Heiberg et al., 2002; Joca e Guimarães, 2006). O tratamento sistêmico com inibidores seletivos da nNOS também suprimiu as alterações comportamentais do tipo depressivas induzidas pela exposição a protocolos de estresse crônico (Zhou et al., 2007; Yazir et al., 2012). A ideia de um envolvimento do óxido nítrico na neurobiologia da depressão é reforçada por dados demonstrando que o bloqueio sistêmico da enzima guanilato ciclase solúvel promoveu efeito do tipo antidepressivo em modelos animais de

depressão (Heiberg et al., 2002; Yazir et al., 2012), além de promover melhora do humor em pacientes deprimidos (Naylor et al., 1987).

Um papel do NO na neurobiologia da ansiedade também tem sido demonstrado, porém os resultados são contraditórios. Neste sentido, vários estudos pré-clínicos tem demonstrado que a administração sistêmica de inibidores não-seletivos da síntese de NO ou seletivos para a nNOS produz alterações comportamentais do tipo ansiolítico em modelos experimentais como o labirinto em cruz elevado, o teste de interação social e o teste de claro/escuro (para revisão ver Guimarães et al., 2005; Sestakova et al., 2013). Entretanto, efeitos ansiogênicos nos testes comportamentais em campo aberto e o labirinto em cruz elevado foram reportados em alguns estudos após o tratamento sistêmico com inibidores da síntese de NO (Guimarães et al., 2005; Sestakova et al., 2013). Estudos investigando o efeito de microinjeções centrais de inibidores da síntese de NO também produziram resultados contraditórios (Sestakova et al., 2013), porém um conjunto relevante de trabalhos tem demonstrado efeitos do tipo ansiolítico após a administração em sítios específicos no sistema nervoso central, como a substância cinzenta periaquedutal, o córtex pré-frontal medial, a amígdala e o hipocampo (Guimarães et al., 2005; Forestiero et al., 2006; Spolidório et al., 2007; Resstel et al., 2008b). Foi proposto que um efeito sedativo observado com doses baixas dos inibidores poderia explicar os efeitos ansiogênicos observados em alguns estudos (Guimarães et al., 2005), uma vez que vários dos modelos experimentais utilizados dependem do comportamento locomotor dos animais. Além disso, em altas doses os inibidores podem ser convertidos em L-arginina (precursor da síntese de NO) (Hecker et al., 1990), o que também pode explicar os resultados contraditórios (Guimarães et al., 2005). Deste modo, tem sido proposto que os efeitos dos inibidores da síntese de NO sobre comportamentos relacionados à ansiedade dependem da dose utilizada (Guimarães et al., 2005; Sestakova et al., 2013).

A nNOS é expressa em regiões bulbares e supra-bulbares do sistema nervoso central envolvidas no controle da função autonômica e cardiovascular (Zanzinger, 2002; Stern, 2004). Neste sentido, foi demonstrado um envolvimento do óxido nítrico formado a partir da nNOS no sistema nervoso central na regulação da pressão arterial e frequência cardíaca, da atividade barorreflexa, bem como das respostas cardiovasculares observadas durante reações de defesa (Zanzinger et al., 1999; Carvalho et al., 2006; Resstel et al., 2008b; Alves et al., 2009; Fabri et al., 2014;

Moraes-Neto et al., 2014). Além disso, alterações em mecanismos nitrérgicos no sistema nervoso central parecem estar envolvidas na fisiopatologia de complicações cardiovasculares como a hipertensão e a insuficiência cardíaca (De Wardener, 2001; Patel e Zheng, 2012; Pyner, 2014).

Apesar de muitas das regiões no sistema nervoso central envolvidas no controle da função cardiovascular também serem implicadas na neurobiologia da depressão e da ansiedade (por exemplo: hipocampo, córtex pré-frontal medial e amígdala) (Ulrich-Lai e Herman, 2009; Canteras et al., 2010; Willner et al., 2013), informações acerca dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nas complicações cardiovasculares acompanhando alterações comportamentais induzidas pelo estresse crônico são escassas. Dados recentes do nosso grupo demonstraram que o tratamento sistêmico crônico com um inibidor preferencial da nNOS preveniu tanto as alterações comportamentais quanto as disfunções cardiovasculares desencadeadas pelo estresse crônico variável (um modelo de estresse crônico psicológico) (Almeida et al., 2015). Apesar de um possível envolvimento de mecanismos nitrérgicos nas alterações comportamentais e cardiovasculares induzidas pelo isolamento social nunca ter sido investigado, os resultados acima fornecem evidências de que o NO formado a partir da nNOS pode ser um importante mecanismo neuroquímico envolvido na associação entre transtornos psiquiátricos e problemas cardiovasculares. Entretanto, os possíveis sítios específicos no sistema nervoso central mediando o envolvimento do NO nesta associação são desconhecidos.

#### **1.4. Hipocampo dorsal e nNOS: depressão, ansiedade e respostas cardiovasculares ao estresse**

O NO formado a partir da nNOS tem sido demonstrado ser um importante mecanismo neuroquímico no hipocampo dorsal envolvido no controle de comportamentos relacionados à depressão e ansiedade, como também nos ajustes cardiovasculares durante situações aversivas. Neste sentido, foi reportado um aumento na expressão da nNOS no hipocampo de pacientes deprimidos (Oliveira et al., 2008). Estudos pré-clínicos demonstraram que a microinjeção de inibidores seletivos da nNOS no hipocampo dorsal induziu alterações comportamentais do tipo antidepressivas no teste de nado forçado (Joca e Guimarães, 2006; Hiroaki-Sato et al., 2014). Além disso, o tratamento sistêmico com um inibidor da nNOS reduziu as alterações observadas após a exposição ao teste de nado forçado na expressão de genes no hipocampo relacionados

ao estresse oxidativo, neuroplasticidades e processos neurogênicos (Ferreira et al., 2012). Um envolvimento do NO formado a partir da nNOS no hipocampo dorsal em repostas comportamentais relacionadas à ansiedade também foi reportada. Por exemplo, a microinjeção de inibidores da síntese de NO não-seletivos ou seletivos para a nNOS no hipocampo dorsal produziu efeitos ansiolíticos no labirinto em cruz elevado, no teste de campo aberto, no teste de alimentação suprimida pela novidade e no modelo de lambar punido de Vogel (Echeverry et al., 2004; Spolidorio et al., 2007; Zhang et al., 2010). A administração no hipocampo dorsal de inibidores da enzima nNOS também reduziu as respostas cardiovasculares induzidas pelo estresse de restrição agudo e o medo condicionado ao contexto (Moraes-Neto et al., 2014; Fabri et al., 2014), assim fornecendo evidências de um envolvimento deste mecanismo de sinalização no hipocampo dorsal nos ajustes cardiovasculares durante reações de defesa.

Estudos têm demonstrado alterações em mecanismos nitrérgicos do hipocampo após a exposição a protocolos de estresse crônico. Por exemplo, foi demonstrado que a exposição a eventos estressores crônicos, incluindo o estresse de isolamento social (Amiri et al., 2014; Zlatkovic´ et al., 2014), aumentou os níveis de nitrito/nitrato (metabólitos do NO) no hipocampo (Zhou et al., 2007; Tishkina et al., 2012; Mohamed et al., 2013; Rinwa e Kumar, 2014), assim indicando um aumento na formação local de NO. Apesar de um aumento na expressão da iNOS no hipocampo ter sido reportado após a exposição crônica a eventos estressores (Fan et al., 2011), a elevação na formação local de NO parece ser decorrente principalmente de alterações na expressão local da nNOS, uma vez que aumento na expressão desta isoforma da NOS foi reportado no hipocampo de animais expostos a protocolos de estresse crônico (Zhou et al., 2007; Zhou et al., 2011; Hu et al., 2012; Zhu et al., 2014; Zlatkovic´ et al., 2014), e o tratamento sistêmico com um inibidor da nNOS reverteu os níveis elevados de nitrito/nitrato no hipocampo induzidos pelo estresse crônico (Mohamed et al., 2013).

Estas alterações na formação de NO a partir da nNOS no hipocampo parecem ser um mecanismo importante envolvido nas patologias induzidas pelo estresse crônico. Neste sentido, tem sido demonstrado que a redução nos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, BDNF) na neurogênese no hipocampo induzidas pela exposição a protocolos de estresse crônico, alterações que tem sido implicada na neurobiologia da ansiedade e da depressão (Nestler et al., 2002; Castrén et al., 2007; Martinowich et al., 2007), foram inibidas pelo tratamento sistêmico com

inibidores da nNOS (Zhou et al., 2007; Yazir et al., 2012). Um estudo recente demonstrou que a administração intrahipocampal de agentes que inibem o acoplamento da nNOS com a ligante PDZ carboxi-terminal da proteína neuronal óxido nítrico sintase (CAPON), na qual compete com a proteína de densidade pós-sináptica 95 (PSD95) pela ligação na enzima nNOS e reduz à sinalização do receptor NMDA glutamatérgico via nNOS (Jaffrey et al., 1998), revertem as alterações comportamentais do tipo ansiogênicas induzidas pelo estresse crônico variável (Zhu et al., 2014). Além disso, a microinjeção de um inibidor da nNOS no hipocampo inibiu as alterações comportamentais relacionadas à depressão induzidas pelo estresse crônico variável (Zhou et al., 2011). Entretanto, em uma ampla busca na literatura nós não encontramos evidências acerca de um envolvimento de alterações em mecanismos nitrérgicos do hipocampo nas alterações cardiovasculares e comportamentais induzidas por protocolos de estresse de isolamento social.

Os dados apresentados acima fornecem evidências de que alterações na formação de NO a partir da nNOS no hipocampo pode ser um importante mecanismo relacionado com as alterações comportamentais e fisiológicas desencadeadas pela exposição prolongada a situações aversivas. Deste modo, considerando as evidências de um papel da nNOS no hipocampo dorsal no controle da função cardiovascular e de respostas comportamentais, *uma segunda hipótese investigada no presente estudo foi a de que alterações na formação de NO a partir da nNOS no hipocampo dorsal estejam envolvidas nas alterações cardiovasculares e comportamentais relacionadas à depressão e ansiedade induzidas pelo isolamento social, assim podendo constituir um possível mecanismo envolvido na comorbidade entre ansiedade/depressão e complicações cardiovasculares.*

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi investigar o envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal no controle da função cardiovascular e das respostas autônomas e comportamentais ao estresse social crônico. Para tanto, os objetivos específicos foram:

1) Avaliar a participação da neurotransmissão nitrérgica mediada pela nNOS, iNOS e eNOS no hipocampo dorsal no controle das respostas cardíacas do barorreflexo;

2) Estudar o envolvimento da neurotransmissão nitrérgica mediada pela nNOS no hipocampo dorsal nas alterações na responsividade cardiovascular a uma sessão aguda de estresse desencadeada pelo isolamento social;

3) Investigar a participação da neurotransmissão nitrérgica mediada pela nNOS no hipocampo dorsal nas alterações de comportamentos relacionados à ansiedade e depressão desencadeadas pelo isolamento social;

4) Investigar o efeito do isolamento social na expressão de nitrotirosina e da nNOS na formação local de NO no hipocampo dorsal.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar (21 ou 60 dias) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP). Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP) em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 7h), com livre acesso a alimento e água. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR/UNESP nº 36/2015.

#### **3.2. Isolamento social**

O isolamento social foi realizado conforme procedimento descrito previamente (Fone e Porkess, 2008). Deste modo, aos 21 dias de idade, os animais sujeitos ao procedimento de isolamento foram alojados individualmente por 5 semanas, enquanto os animais controle de mesma idade foram alojados em 4 animais/caixa pelo mesmo período. Os animais isolados foram mantidos no mesmo Biotério que os animais controle e mantiveram contato visual, olfatório e auditivo com os demais animais (Fone e Porkess, 2008; Martin et al., 2010; Cruz et al., 2015). Os animais foram perturbados somente para a limpeza das caixas e registro do peso corporal, que foi realizada duas vezes na semana para os animais controle e uma vez na semana para os animais isolados (Fone e Porkess, 2008; Martin et al., 2010; Cruz et al., 2015).

#### **3.3. Implante de cânulas guias no hipocampo dorsal**

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

Ântero-posterior: -4,0 mm em relação ao bregma

Lateral: +2,8 mm a partir da linha média

Vertical: -3,1 mm em relação ao osso

Incisivo: -2,5mm

Após o posicionamento da cânula de aço inoxidável, foram feitos orifícios no crânio com auxílio de broca odontológica, por onde foram introduzidas cânulas constituídas por um segmento de agulha hipodérmica (26 x 0,6mm, gauge) com 8 mm de comprimento bilateralmente. As cânulas foram fixadas ao crânio com uma resina acrílica autopolimerisável (Simples, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), e pequenos parafusos foram previamente implantados na calota craniana para fixação da resina. Um mandril com 0,2 mm de diâmetro foi introduzido nas cânulas, evitando a obstrução das mesmas durante o período de recuperação do animal. Como medida profilática, ao final da cirurgia os animais receberam 0,2 mL de pentabiótico veterinário (Fountoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) pela via subcutânea.

#### **3.4. Canulação da artéria e veia femorais**

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/Kg, i.p.), e foi implantado um cateter na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares e, quando necessário, outro na veia femoral para infusão de fármacos. Os cateteres foram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13 cm) (Clay Adams, EUA), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina), e obstruídos com pino de metal. Após a implantação dos cateteres, estes foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica. Os animais foram mantidos em caixas individuais após a cirurgia. Como medida profilática, os animais receberam 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) pela via subcutânea.

### **3.5. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca**

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

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

Os registros da temperatura cutânea da cauda foram feitos utilizando um termovisor (IRI4010, Inglaterra). A análise foi feita através de um software para análise termográfica, e a temperatura foi representada por variações de intensidade de cor (Vianna e Carrive, 2005; Cruz et al., 2012; Oliveira et al., 2018). Para análise das imagens, a medida de temperatura foi realizada em 5 pontos da cauda do animal, e a média foi calculada para cada registro.

### **3.7. Avaliação da atividade barorreflexa**

A atividade do barorreflexo foi avaliada através de alterações na PAM induzidas pela infusão intravenosa de fenilefrina (agonista seletivo dos adrenocetores  $\alpha_1$ ) (50 $\mu$ g/mL a 0.32 mL/min/kg) e de nitroprussiato de sódio (NPS) (doador de óxido nítrico) (70 $\mu$ g/mL a 0.8 mL/min/kg), utilizando uma bomba de infusão (K.D. Scientific, EUA) (Crestani et al., 2011; Cruz et al., 2015). Fenilefrina e NPS causam aumento e redução na pressão arterial, respectivamente. A análise foi feita relacionando a variação na pressão arterial (PAM) (10, 20, 30 e 40 mmHg) com a variação reflexa correspondente da frequência cardíaca (FC). Utilizando os pontos obtidos da correlação na variação da PAM e FC durante as infusões de fenilefrina e NPS foram traçadas curvas de regressão linear para análise individual da atividade barorreflexa durante o efeito pressor e depressor na pressão arterial (Crestani et al., 2010a; Cruz et al., 2015). A inclinação das linhas de regressão linear (i.e., ganho em bpm/mmHg) e a resposta de FC máxima, na qual foi a resposta reflexa causada pela variação de 40mmHg na PAM, foram usadas para a análise da função barorreflexa.

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

O estresse por restrição agudo consistiu na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos (diâmetro=6,5 cm, comprimento=15 cm, ventilados por buracos de ½ polegada que preenchem aproximadamente 20% do tubo). No presente estudo, os animais foram mantidos por um período de 30 minutos no tubo de restrição (Choi et al., 2008; Cruz et al., 2012; Oliveira et al., 2015). Cada animal foi submetido a apenas uma sessão de restrição para evitar habituação.

### **3.9. Teste de nado forçado**

O teste de nado forçado foi utilizado para avaliação de comportamentos do tipo depressivo. Os procedimentos foram semelhantes àqueles descritos inicialmente por Porsolt e colaboradores (1977). Deste modo, os animais foram colocados individualmente em um cilindro de plástico (30 cm de diâmetro por 40 centímetros de altura) completo com 30 centímetros de água a  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos (primeira sessão) (Crestani et al., 2010b; Almeida et al., 2015). Em seguida, os animais foram removidos e deixados secar em uma gaiola separada antes de regressar às suas gaiolas de origem. Vinte e quatro horas após os animais foram novamente colocados no cilindro durante 5 minutos (segunda sessão) (Crestani et al., 2010b; Almeida et al., 2015). As duas sessões foram gravadas em vídeo e o tempo de imobilidade (definida como a falta de movimento de todo o corpo, exceto pelos pequenos movimentos necessários para a flutuação) foi registrado por um experimentador que desconhecia os grupos experimentais. A água foi trocada entre os animais em ambas as sessões.

### **3.10. Teste do labirinto em cruz elevado**

O teste do labirinto em cruz elevado foi utilizado para avaliação dos efeitos do isolamento social sobre comportamentos relacionados à ansiedade. O aparato utilizado para o teste consiste 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 possuem paredes de madeira de 40 cm de altura que os circundam, e os braços abertos possuem uma borda lateral de acrílico de 1cm para evitar a queda dos animais. Os roedores evitam os braços abertos, e fármacos ansiolíticos normalmente aumentam a exploração dos braços abertos, sem interferir com o número de entradas nos braços fechados (Pellow e File, 1986). No intervalo entre os testes de

cada animal o labirinto foi limpo com uma solução de álcool (70%). O comportamento foi gravado por uma câmera de vídeo (HNS-15B-Sony) por um período de 5 minutos. Os filmes foram analisados pelo programa X-PLOT-RAT 2005 (Brasil), e foi registrado o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados.

### **3.11. Quantificação da expressão da nNOS e da nitrotirosina no hipocampo dorsal**

#### 3.11.1 Microdissecção do hipocampo dorsal

Os animais foram eutanasiados por decapitação e os encéfalos foram rapidamente removidos, congelados e estocados em freezer -80°C até a realização de procedimento de microdissecção do hipocampo dorsal. Microdissecções do hipocampo dorsal foram obtidas por meio de uma agulha de ponta chata de 14 Gauge a partir de secção coronal da região do hipocampo dorsal obtida em um criostato (-20°C) (CM1900, Leica, Alemanha). As amostras foram obtidas a partir das coordenadas de -2,1 mm a -5,2 mm em relação ao bregma, de acordo com parâmetros obtidos do Atlas de Paxinos e Watson (1997). Após a dissecação, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para posterior análise.

#### 3.11.2 Quantificação dos níveis proteicos da nNOS e da nitrotirosina no hipocampo dorsal

Os níveis de nNOS e de nitrotirosina no hipocampo dorsal foram quantificados por meio da técnica de *Western Blotting*, conforme método padronizado em nosso laboratório (Marin et al., 2008). Brevemente, as amostras foram homogeneizadas por meio de ondas de ultrassom em solução de SDS 1% e coquetel de inibidores de fosfatase e proteases (Sigma-Aldrich®). O conteúdo total de proteínas foi determinado utilizando o kit Bio-Rad®. A quantidade de proteína foi ajustada para 30µg. As proteínas contidas nas amostras foram separadas em gel de SDS-poliacrilamida 9% e transferidas para uma membrana de PVDF-LFP (GE, Healthcare). Após o bloqueio com solução de soroalbumina bovina (BSA) 5% em tampão TBST por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação, as membranas foram incubadas por 18 horas a 4°C com o anticorpo primário contra nNOS total (Mouse NOS1 Antibody monoclonal IgG, Santa Cruz) ou nitrotirosina (Rabbit Anti-Nitrotyrosine antibody, Sigma-Aldrich). Após a lavagem em tampão TBST por 5 min, as membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado

fluoróforo anti-Rabbit IgG (Goat- $\alpha$ -Rabbit IgG-Cy3, GE Healthcare) ou anti-mouse IgG (Goat- $\alpha$ -Mouse IgG-Cy5, GE Healthcare). Após isto, protegidas da luz, as membranas foram secas em papel de filtro e a fluorescência das bandas foi detectada diretamente a partir das membranas utilizando-se o escâner Typhoon® Trio (GE Healthcare). A quantidade de nitrotirosina e nNOS foi expressa como % em relação ao grupo controle. O controle de carregamento era realizado pela coloração de membranas de PVDF com azul de Coomassie, seguida de quantificação de proteína total em toda a faixa.

### **3.12. Microinjeção de drogas no hipocampo dorsal**

As agulhas injetoras (33G, Small Parts, EUA) que foram utilizadas para a microinjeção das drogas no hipocampo dorsal foram um mm mais longo do que as cânulas guias fixada ao crânio, e foram conectadas a uma seringa de 2 $\mu$ l (7002KH, Hamilton, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10). As drogas e a salina foram injetadas no volume de 500nL (Moraes-Neto et al., 2014; Fabri et al., 2014; Hiroaki-Sato et al., 2014).

### **3.13. Determinação anatômica dos sítios de injeção no encéfalo**

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.p.) e 500nL do corante azul de Evans (10%) foi microinjetado bilateralmente no encéfalo para determinação do sítio de injeção. Em seguida, os ratos foram perfundidos e os cérebros removidos, pós-fixados e posteriormente seccionados em cortes frontais de 40  $\mu$ m de espessura com auxílio de um criostato (CM1900, Leica, Alemanha) para análise dos sítios de injeção. Os locais de injeção foram identificados nos diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1997).

### **3.14. Drogas e Soluções.**

N-propyl-L-arginina (NPLA) (Tocris, EUA) (0.1nmol/500nL; inibidor seletivo da nNOS), carboxy-PTIO (Tocris, EUA) (2nmol/500nL; sequestrador de NO), 1400W (inibidor seletivo da iNOS) (Tocris), N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride L-NAME (inibidor não seletivo da NOS) (Sigma-Aldrich), cloridrato de fenilefrina (Sigma-Aldrich, EUA), nitroprussiato de sódio di-hidratado (Sigma-Aldrich, EUA) e tribromoetanol (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em solução salina (0,9% NaCl). Flunixinina meglumina (Banamine ®, Schering-Plough, Cotia, SP, Brasil) e a

preparação de poli-antibiótico (Pentabiotico ®, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) foram utilizados como fornecidos pelo fabricante.

### **3.15. Análises estatísticas**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados utilizando os programas GraphPad Prism® e Statistica. Os valores basais de FC e PAM, assim como os parâmetros das curvas barorreflexas, foram comparados pelo teste *t* de Student (*protocolo 4.1*). A análise de variância (ANOVA) trifatorial, com isolamento (controle vs isolamento) e tratamento (veículo vs tratamento farmacológico) como fatores independentes e tempo como medida repetida foram usados para comparar as curvas temporais de variação da pressão arterial, FC e temperatura cutânea da cauda durante o estresse por restrição agudo (*protocolo 4.3*). A ANOVA bifatorial, com isolamento (controle vs isolamento) e tratamento (antes vs após tratamento farmacológico) como fatores independentes, foi utilizada para a análise dos resultados dos (*protocolos 4.2 e 4.4*). Os resultados da expressão da nNOS e dos níveis de nitrotirosina no hipocampo dorsal foram analisados utilizando o teste *t* de Student (*protocolo 4.4*). Os resultados dos testes estatísticos com  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

### 4.1. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal na atividade barorreflexa

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilateral direcionada ao hipocampo dorsal, e mantidos em recuperação por 3 dias. Em seguida, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação de cateteres na artéria e veia femoral. Vinte quatro horas após, os animais foram levados em suas respectivas caixas para a sala de experimentação, e mantidos por 60 minutos, para habituação às condições de som e iluminação da sala, antes do início dos experimentos. Em seguida, cada animal foi conectado ao sistema de registro cardiovascular em sua respectiva caixa e um registro de 30 minutos foi realizado para determinação dos valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca.

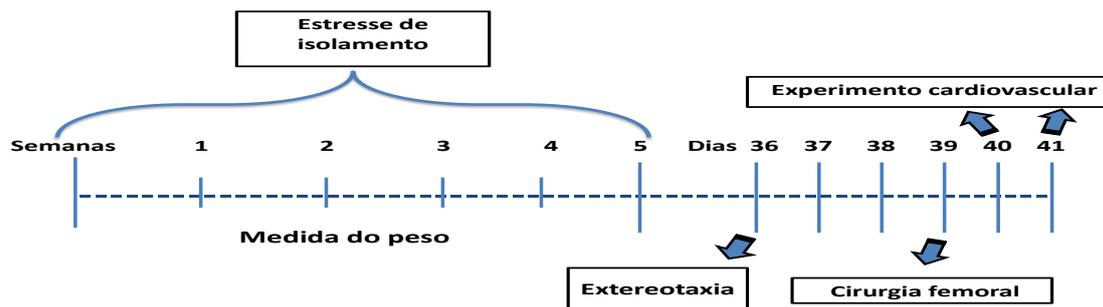
Para avaliação do papel da neurotransmissão nitrérgica hipocampal, bem como a influência específica da nNOS, iNOS e eNOS locais, foram realizadas infusões intravenosas de fenilefrina e nitroprussiato de sódio para determinação dos valores controle da atividade barorreflexa. Posteriormente, conjuntos independentes de animais receberam microinjeção bilateral no hipocampo dorsal do sequestrador de NO carboxy-PTIO (2nmol/500nL), do inibidor seletivo de nNOS NPLA (0,1nmol/500nL), do inibidor seletivo de iNOS 1400W (0,02nmol/500nL) ou veículo (solução salina, 500 nL) (Moraes-Neto et al., 2014; Fabri et al., 2014; Hiroaki-Sato et al., 2014). Além disso, para avaliação do papel da eNOS, o efeito da microinjeção bilateral no hipocampo dorsal do inibidor não-seletivo da NOS N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME, 50nmol/500nL) (grupo L-NAME+NPLA+1400W) ou veículo (salina, 500nL) (grupo veículo+NPLA+1400W) foram comparados em animais submetidos ao bloqueio de nNOS e iNOS locais via co-tratamento hipocampal com uma solução contendo NPLA (0,1nmol/500nL) + 1400W (0,02nmol/500nL) (Barreto-de- Souza et al., 2018). Dez minutos após o tratamento farmacológico do hipocampo, as infusões de fenilefrina e NPS foram repetidas. Infusões de fenilefrina e NPS para avaliação da função barorreflexa foram randomizados dentro de cada grupo experimental.

#### **4.2. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações cardiovasculares induzidas pelo isolamento social**

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais:

- |                       |                      |
|-----------------------|----------------------|
| 1) Controle + veículo | 4) Isolado + veículo |
| 2) Controle + NPLA    | 5) Isolado + NPLA    |
| 3) Controle + c-PTIO  | 6) Isolado + c-PTIO  |

Os “animais dos grupos isolados” foram submetidos ao protocolo de estresse de isolamento social durante 5 semanas. Depois deste período, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantações de cânulas guias bilaterais direcionadas ao hipocampo dorsal, e mantidos em recuperação por 3 dias. Em seguida, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação de cateter na artéria e veia femoral. Vinte quatro horas após, os animais foram levados em suas respectivas caixas para a sala de experimentação e mantidos por 1 hora, para habituação às condições de som e iluminação da sala, antes do início dos experimentos. Em seguida, cada animal foi conectado ao sistema de registro cardiovascular em sua respectiva caixa, e um registro de 30 minutos foi realizado para determinação dos valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca. Então, grupos independentes de animais controle e submetidos ao isolamento social receberam microinjeção bilateral no hipocampo dorsal de NPLA (0.1nmol/500nL; inibidor seletivo da nNOS), carboxy-PTIO (2nmol/500nL; sequestrador de NO) ou veículo (salina, 500nL) (Moraes-Neto et al., 2014; Fabri et al., 2014; Hiroaki-Sato et al., 2014). A figura 1 ilustra o protocolo experimental.



**Figura 1.** Protocolo experimental para o estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica no hipocampo dorsal nas alterações cardiovasculares e das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição aguda induzidas pelo isolamento social.

#### **4.3. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição aguda induzida pelo isolamento social**

Resultados recentes do nosso laboratório demonstraram que o isolamento social reduziu as respostas de aumento da pressão arterial e frequência cardíaca e de redução da temperatura cutânea da cauda (decorrente da vasoconstrição cutânea) induzidas pelo estresse por restrição aguda em ratos (*dados não publicados*). Deste modo, este protocolo teve o objetivo de investigar um envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nestas alterações. Este experimento foi realizado 24h após a avaliação da atividade barorreflexa descrita no protocolo anterior (ver item 4.2), conforme ilustrado na figura 1. Dados do nosso laboratório demonstraram que a infusão intravenosa de agentes vasoativos 24h antes não afeta as respostas cardiovasculares ao estresse por restrição aguda (*dados não publicados*). Além disso, resultados têm demonstrado respostas cardiovasculares similares após a microinjeção repetida de fármacos no hipocampo dorsal (Santini et al., 2013), o que indica que o tratamento farmacológico do hipocampo dorsal 24h antes não interferiu na análise do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica deste núcleo nas alterações das respostas cardiovasculares ao estresse por restrição induzidas pelo isolamento social.

No dia do experimento, os animais foram levados em suas respectivas caixas para a sala de experimentação e mantidos por uma hora, para habituação às

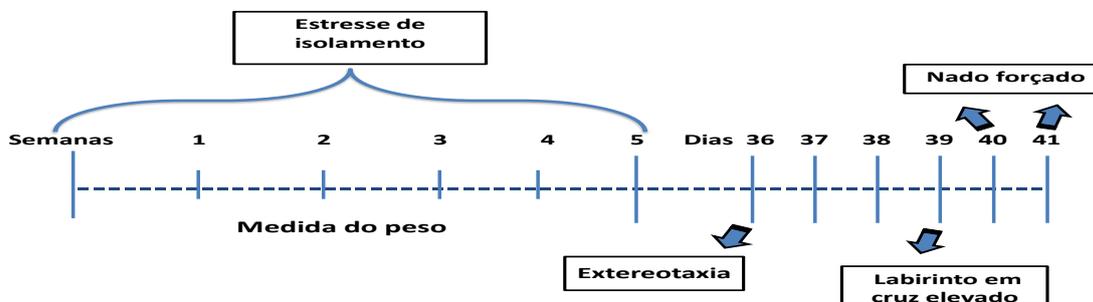
condições de som e iluminação da sala, antes do início dos experimentos. Em seguida, cada animal foi conectado ao sistema de registro cardiovascular em sua respectiva caixa, e um registro de 30 minutos foi realizado para determinação dos valores basais de pressão arterial e FC. Após este período, grupos independentes de animais controle e submetidos ao isolamento social receberam microinjeção bilateral no hipocampo dorsal de NPLA (0.1nmol/500nL; inibidor seletivo da nNOS), carboxy-PTIO (2nmol/500nL; sequestrador de NO) ou veículo (salina, 500nL) (Moraes-Neto et al., 2014; Fabri et al., 2014; Hiroaki-Sato et al., 2014). Dez minutos após o tratamento farmacológico do hipocampo dorsal, os animais foram submetidos a uma sessão de 30 minutos de estresse por restrição. Os registros de pressão arterial e frequência cardíaca foram realizados durante todo o período de restrição. A vasoconstricção cutânea durante situações aversivas reduz a temperatura da pele (Vianna e Carrive, 2005; Cruz et al., 2012). Deste modo, a temperatura cutânea da cauda foi medida aos 10, 5 e 0 min antes de restrição, e a cada 5 minutos durante a exposição ao estresse por restrição (Cruz et al., 2012), como uma medida indireta de vasoconstricção cutânea.

#### **4.4. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações comportamentais induzidas pelo estresse de isolamento social**

Este protocolo teve o objetivo de investigar o envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações comportamentais relacionadas à depressão e ansiedade induzidas pelo isolamento social. Os testes comportamentais e os procedimentos foram realizados conforme descrito previamente em estudos que investigaram os efeitos comportamentais do isolamento social (Grippio et al., 2008; Fisher et al., 2012). Deste modo, os animais foram submetidos ao protocolo de estresse de isolamento social durante 5 semanas. Depois deste período, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias bilateral direcionada ao hipocampo dorsal, e mantidos em recuperação por 3 dias. No dia do experimento, os animais foram levados em caixas individuais para a sala de experimentação e mantidos em repouso por uma hora, para habituação às condições de som e iluminação da sala. Em seguida, grupos independentes de animais controle e submetidos ao isolamento social receberam microinjeção bilateral no hipocampo dorsal de NPLA (0.1nmol/500nL; inibidor da nNOS), carboxy-PTIO (2nmol/500nL; sequestrador de NO) ou veículo (salina, 500nL) (Moraes-Neto et al., 2014; Fabri et al., 2014; Hiroaki-Sato et al., 2014). Dez minutos após, cada animal foi colocado

individualmente no labirinto em cruz elevado por 5 minutos para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade.

Vinte quatro horas após o teste do labirinto em cruz elevado foi realizada a primeira sessão de 15 minutos do teste de nado forçado. Imediatamente após o término da primeira sessão, grupos independentes de animais controle e submetidos ao isolamento social receberam microinjeção bilateral no hipocampo dorsal de NPLA (0.1 nmol/500 nL; inibidor da nNOS), carboxy-PTIO (2 nmol/500 nL; sequestrador de NO) ou veículo (salina, 500nL) (Moraes-Neto et al., 2014; Fabri et al., 2014; Hiroaki-Sato et al., 2014). Vinte quatro horas após, os animais foram submetidos à segunda sessão de nado forçado, com duração de 5 minutos. O regime de tratamento no teste de nado forçado foi baseado em estudos prévios demonstrando que efeitos do tipo antidepressivos foram observados quando o tratamento do hipocampo com inibidores da nNOS foi realizado após a primeira sessão de nado forçado (Joca e Guimarães, 2006; Hiroaki-Sato et al., 2014). A figura 2 ilustra o protocolo experimental completo para investigação dos efeitos comportamentais do isolamento social.



**Figura 2.** Protocolo experimental para o estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações comportamentais induzidas pelo isolamento social.

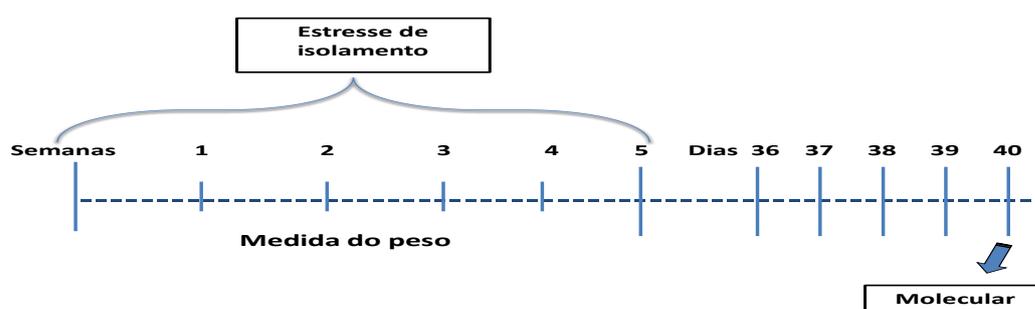
#### **4.5. Estudo do efeito do estresse de isolamento social sobre a expressão de nNOS e nitrotirosina no hipocampo dorsal**

Este protocolo teve o objetivo de investigar se o envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações cardiovasculares e

comportamentais induzidas pelo isolamento social estão associadas com modificações na expressão da nNOS e na formação de NO no hipocampo dorsal. Para tanto, os animais foram submetidos ao protocolo de estresse de isolamento social durante 5 semanas + 5 dias. Os 5 dias adicionais teve o objetivo das análises moleculares coincidirem com o período de realização dos testes cardiovasculares e comportamentos descritos nos protocolos anteriores.

Após o término do protocolo de isolamento social, os animais foram sacrificados por decapitação e os encéfalos foram removidos e estocados em freezer - 80°C para futuro processamento. Animais controle foram mantidos no biotério sem serem perturbados, exceto no período de limpeza das caixas, pelo mesmo período que os animais submetidos ao isolamento, e foram decapitados juntamente com os animais isolados. O hipocampo dorsal de todos os animais foi coletado por microdissecção para quantificação dos níveis proteicos de nNOS e nitrotirosina.

A figura 3 ilustra o protocolo experimental completo para investigação dos efeitos do isolamento social sobre a expressão de nNOS e nitrotirosina.

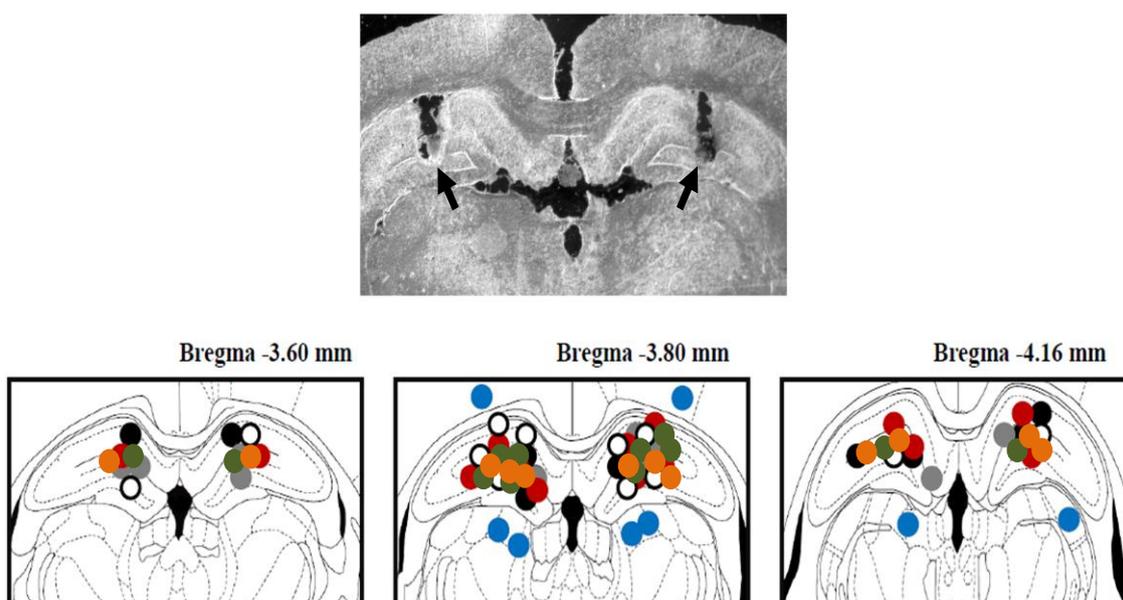


**Figura 3.** Protocolo experimental para o estudo da expressão de nNOS e nitrotirosina no hipocampo dorsal induzidas pelo estresse isolamento social.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal na atividade barorreflexa

Fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro de um animal representativo ilustrando sítios de microinjeção bilaterais no hipocampo dorsal é apresentada na Figura 4. A Figura 4 também apresenta representações diagramáticas mostrando os sítios de microinjeção bilaterais no hipocampo dorsal de carboxy-PTIO, NPLA, 1400W, NPLA+1400W+L-NAME, veículo+NPLA+1400W e veículo; bem como sítios de microinjeção em estruturas ao redor do hipocampo dorsal.



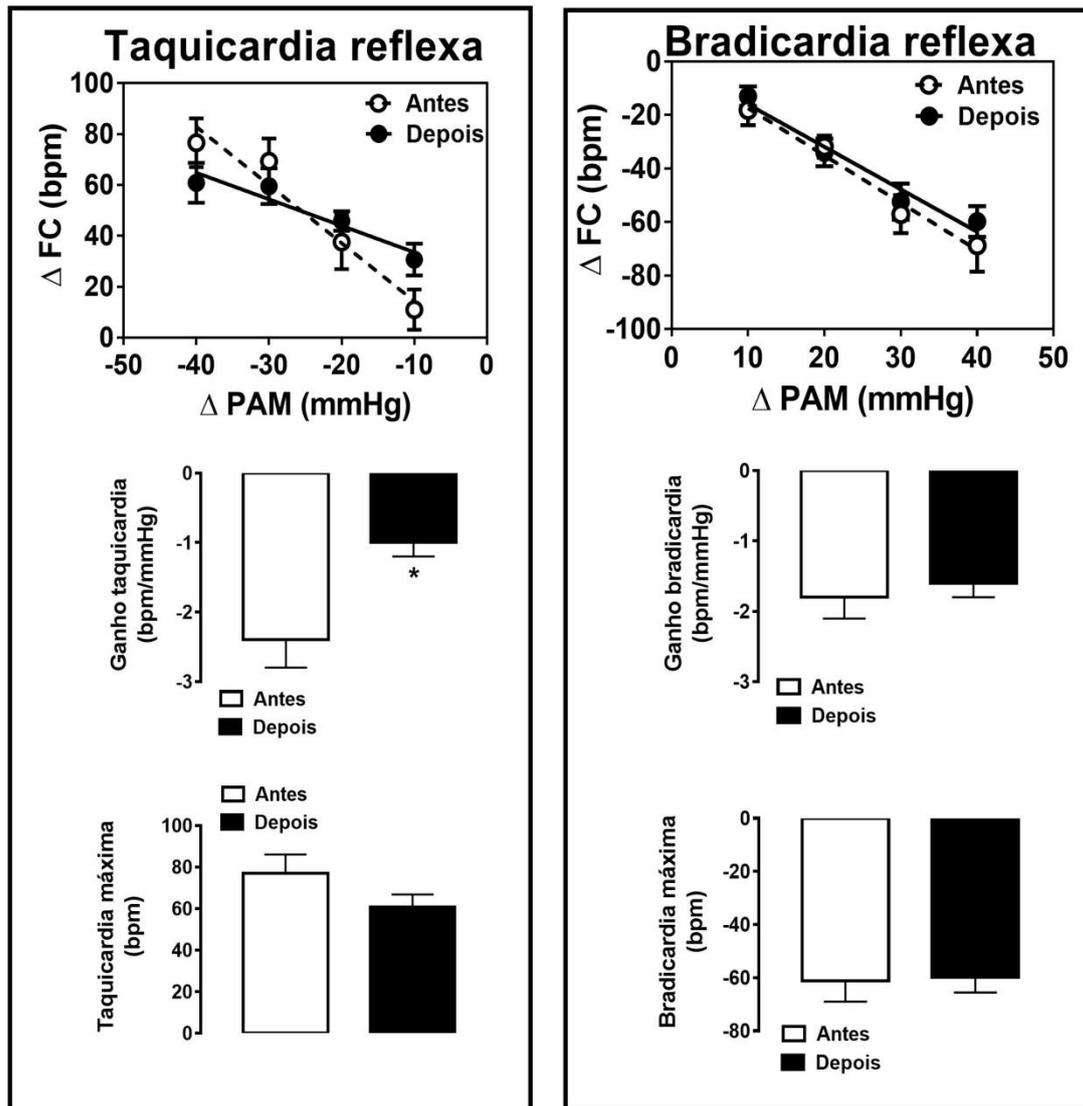
**Figura 4. (Superior)** Microfotografia de uma secção coronal do cérebro que mostra os locais de microinjeção bilateral no hipocampo dorsal de um animal representativo. As setas indicam os locais de microinjeção. **(Inferior)** Representações do diagrama modificadas do atlas do cérebro de rato de Paxinos e Watson (1997) indicando os locais de microinjeção bilaterais no hipocampo dorsal do veículo (círculos abertos), NPLA (círculos pretos), carboxy-PTIO (círculos cinza), 1400W (círculos vermelhos), veículo+NPLA+1400W (círculos verdes) e L-NAME+NPLA+1400W (círculos laranja); bem como locais de microinjeção nas estruturas circundantes do hipocampo dorsal (círculos azuis).

### **5.1.1. Efeitos do tratamento do hipocampo dorsal com o veículo na função barorreflexa em ratos não anestesiados**

A microinjeção bilateral de veículo (salina, 500nL, n=6) no hipocampo dorsal não alterou os valores basais de FC ( $341 \pm 7$  vs  $357 \pm 16$  bpm,  $t = 0,9$ ,  $P > 0,05$ ) e PAM ( $109 \pm 4$  vs  $111 \pm 2$  mmHg;  $t = 0,6$ ,  $P > 0,05$ ). A análise de regressão linear da função barorreflexa também não indicou efeito da microinjeção de veículo no hipocampo dorsal na taquicardia evocada pela diminuição da pressão arterial ( $-2,2 \pm 0,3$  vs  $-2,3 \pm 0,3$  bpm/mmHg;  $t = 0,2$ ,  $P > 0,05$ ) ou bradicardia em resposta ao aumento da pressão arterial ( $-2,0 \pm 0,3$  vs  $-1,9 \pm 0,2$  bpm/mmHg;  $t = 0,2$ ,  $P > 0,05$ ).

### **5.1.2. Efeitos do tratamento hipocampo dorsal com carboxy-PTIO na função barorreflexa em ratos não anestesiados**

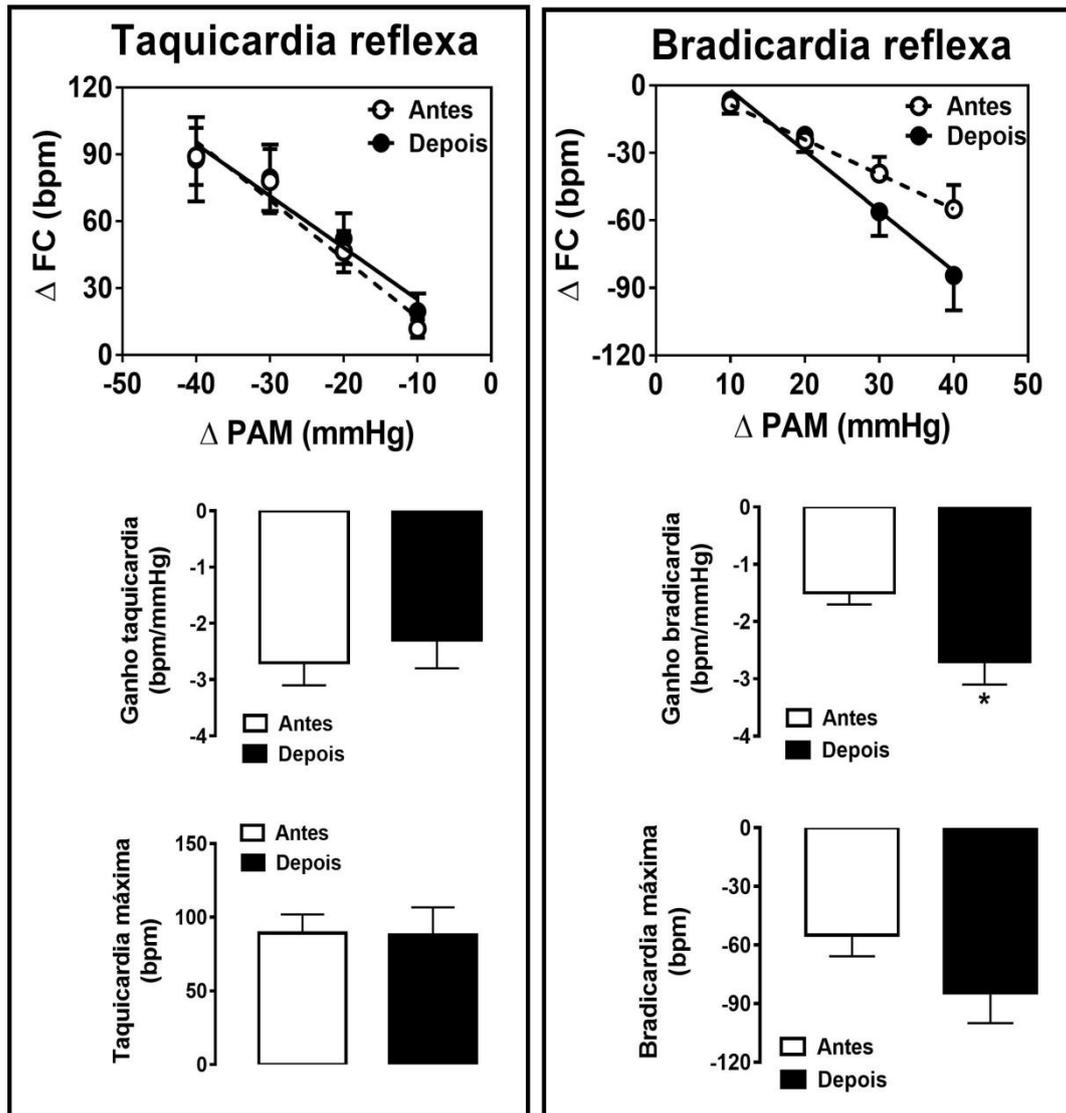
A microinjeção bilateral do carboxy-PTIO (sequestrador de NO, 2nmol/500nL, n=6) no hipocampo dorsal não alterou os valores basais de FC ( $392 \pm 9$  vs  $402 \pm 5$  bpm,  $t = 0,87$ ,  $P > 0,05$ ) e PAM ( $111 \pm 2$  vs  $111 \pm 3$  mmHg;  $t = 0,05$ ,  $P > 0,05$ ). No entanto, a análise de regressão linear da atividade barorreflexa indicou que o tratamento farmacológico do hipocampo dorsal com carboxy-PTIO diminuiu a inclinação das linhas de regressão para a resposta taquicárdica evocada pela diminuição da PAM ( $-2,4 \pm 0,4$  vs  $-1,0 \pm 0,2$  bpm/mmHg;  $t = 3,2$ ,  $P < 0,01$ ), mas sem afetar a bradicardia ao aumento da PAM ( $-1,8 \pm 0,3$  vs  $-1,6 \pm 0,2$  bpm/mmHg;  $t = 0,55$ ,  $P > 0,05$ ) (Fig. 5). As respostas de bradicardia máxima ( $-61 \pm 7$  vs  $-59 \pm 5$  bpm,  $t = 0,1$ ,  $P > 0,05$ ) e taquicardia máxima ( $77 \pm 9$  vs  $60 \pm 6$  bpm,  $t = 1,5$ ,  $P > 0,05$ ) não foram afetadas pelo tratamento do hipocampo dorsal com carboxy-PTIO (Fig. 5).



**Figura 5.** Análise de regressão linear da função barorreflexa correlacionando a alteração da MAP ( $\Delta$ MAP) e a resposta do reflexo da FC ( $\Delta$ FC) em animais que receberam microinjeção bilateral do carboxy-PTIO ( $n=6$ ) no hipocampo dorsal. **(ESQUERDA)** Curvas de regressão linear (superior) (antes:  $r^2$  0.60; depois:  $r^2$  0.42) e inclinação das linhas de regressão (ganho) e resposta máxima (inferior) de taquicardia evocada pela diminuição da pressão arterial em resposta à infusão intravenosa de nitroprussiato de sódio antes e após o tratamento hipocampal com carboxy-PTIO. **(DIREITA)** Curvas de regressão linear (superior) (antes:  $r^2$  0.61; depois:  $r^2$  0.66) e inclinação das linhas de regressão (ganho) e resposta máxima (inferior) de bradicardia evocadas pelo aumento da pressão arterial em resposta à infusão intravenosa de fenilefrina antes e após tratamento hipocampal com carboxy-PTIO.

### **5.1.3. Efeitos do tratamento do hipocampo dorsal com o NPLA na função barorreflexa em ratos não anestesiados**

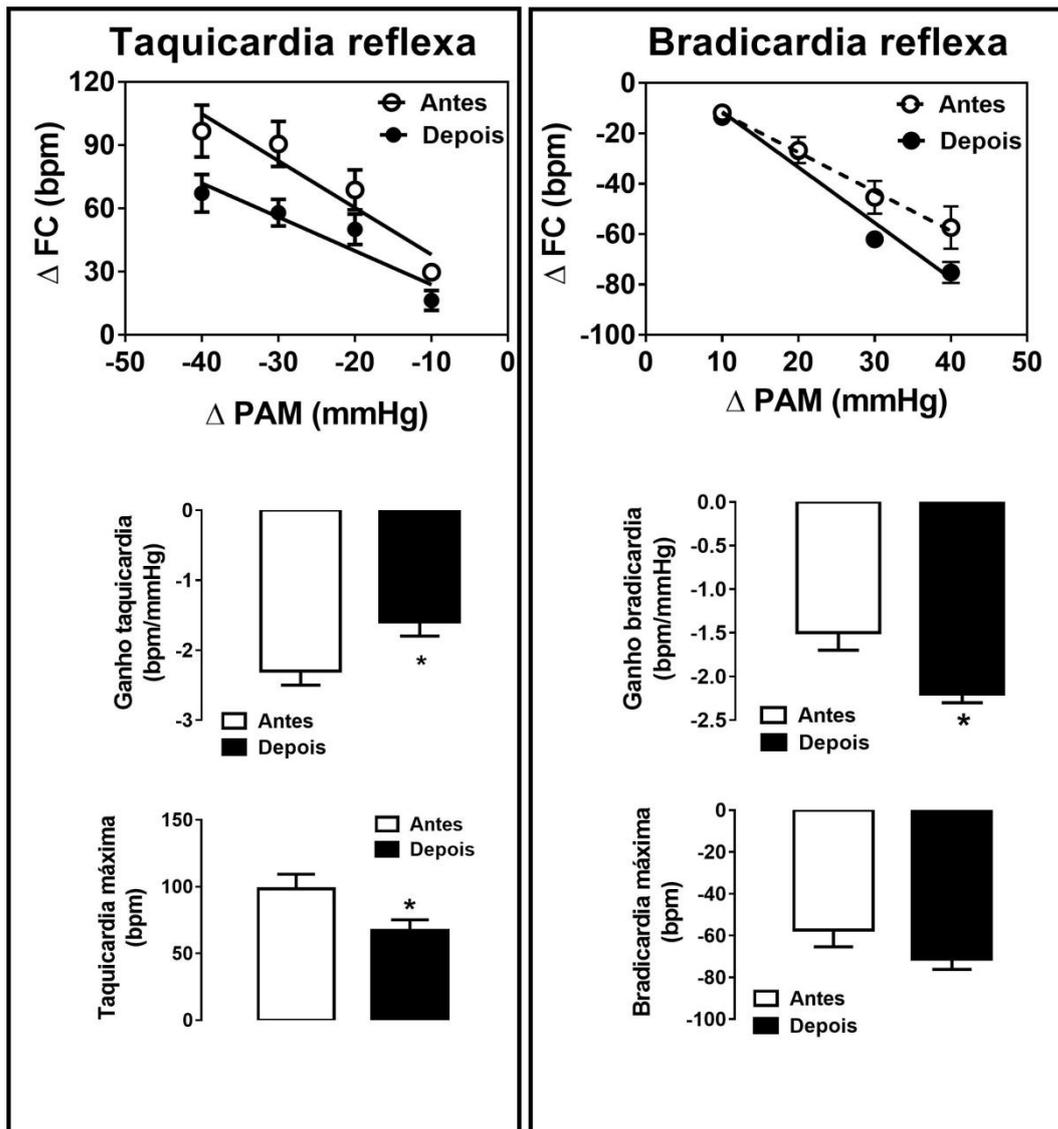
A microinjeção bilateral do inibidor seletivo de nNOS NPLA (0,1nmol/500nL, n=7) no hipocampo dorsal não alterou os valores basais de FC ( $359 \pm 11$  vs  $363 \pm 9$  bpm;  $t = 0,29$ ,  $P > 0,05$ ) e PAM ( $108 \pm 3$  vs  $111 \pm 3$  mmHg;  $t = 0,62$ ,  $P > 0,05$ ). No entanto, a análise de regressão linear da função barorreflexa indicou que o tratamento farmacológico do hipocampo dorsal com o NPLA aumentou a inclinação da linha de regressão para diminuições da FC como resposta aos aumentos de PAM ( $-1,50 \pm 0,2$  vs  $-2,7 \pm 0,4$  bpm/mmHg;  $t = 2,6$ ,  $P < 0,01$ ), mas sem afetar a resposta de taquicardia à queda da PAM ( $-2,7 \pm 0,4$  vs  $-2,3 \pm 0,5$  bpm/mmHg;  $t = 0,6$ ,  $P > 0,05$ ) (Fig. 6). A resposta de bradicardia máxima não foi alterada ( $-55 \pm 11$  vs  $-85 \pm 14$  bpm,  $t = 1,5$ ,  $P > 0,05$ ), assim como a taquicardia máxima ( $89 \pm 12$  vs  $87 \pm 18$  bpm,  $t = 0,1$ ,  $P > 0,05$ ), pelo tratamento do hipocampo dorsal com o NPLA (Fig. 6).



**Figura 6.** Análise de regressão linear da função barorreflexa correlacionando alteração da PAM ( $\Delta PAM$ ) e resposta do reflexo da FC ( $\Delta FC$ ) em animais que receberam microinjeção bilateral do inibidor seletivo da nNOS (NPLA) ( $n=7$ ) no hipocampo dorsal. **(ESQUERDA)** Curvas de regressão linear (superior) (antes:  $r^2$  0.55; depois:  $r^2$  0.50) e inclinação das linhas de regressão (ou seja, ganho) e resposta máxima (parte inferior) da taquicardia evocada pela diminuição da pressão arterial em resposta à infusão intravenosa de nitroprussiato de sódio antes e após o tratamento hipocampal com NPLA. **(DIREITA)** Curvas de regressão linear (superior) (antes:  $r^2$  0.53; depois:  $r^2$  0.60) e inclinação das linhas de regressão (ganho) e resposta máxima (inferior) de bradycardia evocadas pelo aumento da pressão arterial em resposta à infusão intravenosa de fenilefrina antes e após o tratamento hipocampal com NPLA.

#### **5.1.4. Efeitos do tratamento hipocampo dorsal com 1400W na função barorreflexa em ratos não anestesiados**

A microinjeção bilateral do inibidor seletivo da iNOS 1400W (0,02nmol/500nL, n=7) no hipocampo dorsal não alterou os valores basais de FC ( $384 \pm 8$  vs  $411 \pm 15$  bpm;  $t = 1,53$ ,  $P > 0,05$ ) e PAM ( $104 \pm 4$  vs  $108 \pm 3$  mmHg;  $t = 0,74$ ,  $P > 0,05$ ). Entretanto, a análise de regressão linear da atividade barorreflexa indicou que o tratamento farmacológico do hipocampo dorsal com 1400W diminuiu a inclinação da linha de regressão para as respostas de taquicardia evocadas pela diminuição da PAM ( $-2,3 \pm 0,2$  vs  $-1,6 \pm 0,2$  bpm/mmHg;  $t = 2,5$ ,  $P < 0,02$ ), enquanto o ganho de bradicardia para aumento da PAM foi aumentado ( $-1,5 \pm 0,2$  vs  $-2,2 \pm 0,1$  bpm/mmHg;  $t = 3,2$ ,  $P < 0,008$ ) (Fig. 7). A resposta taquicárdica máxima foi reduzida com 1400W ( $99 \pm 11$  vs  $67 \pm 8$  bpm,  $t = 2,3$ ,  $P < 0,04$ ), mas sem alterar significativamente a bradicardia máxima ( $-57 \pm 8$  vs  $-72 \pm 5$  bpm,  $t = 1,5$ ,  $P > 0,05$ ) (Fig. 7).

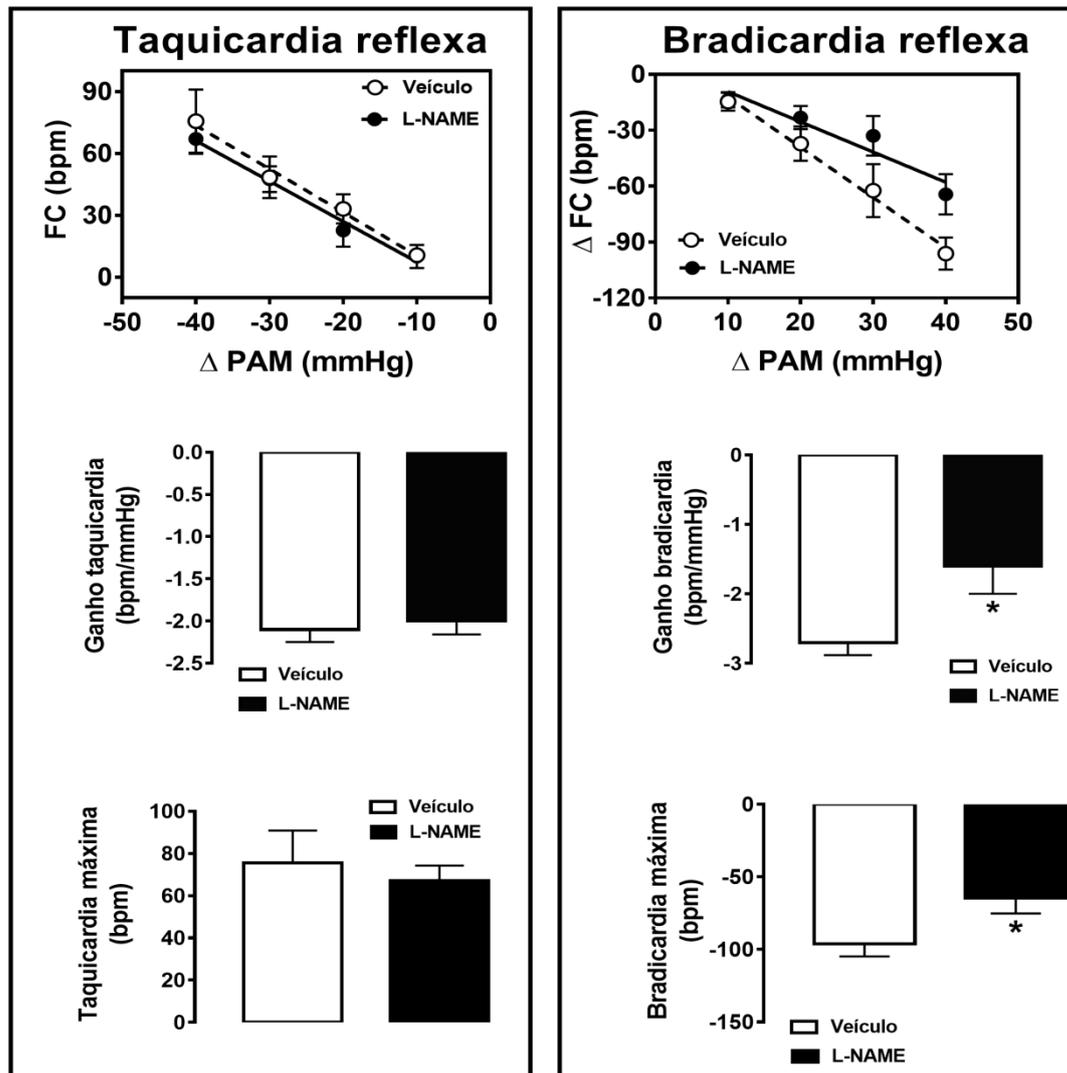


**Figura 7.** Análise de regressão linear da função barorreflexa correlacionando alteração da PAM ( $\Delta PAM$ ) e resposta do reflexo da FC ( $\Delta FC$ ) em animais que receberam microinjeção bilateral do inibidor seletivo da iNOS 1400W ( $n=7$ ) no hipocampo dorsal. **(ESQUERDA)** Curvas de regressão linear (superior) (antes:  $r^2$  0.55; depois:  $r^2$  0.53) e inclinação das linhas de regressão (ganho) e resposta máxima (parte inferior) da taquicardia evocada pela diminuição da pressão arterial em resposta à infusão intravenosa de nitroprussiato de sódio antes e após tratamento hipocampal com 1400W. **(DIREITA)** Curvas de regressão linear (superior) (antes:  $r^2$  0.59; depois:  $r^2$  0.90) e inclinação das linhas de regressão (ganho) e resposta máxima (inferior) de bradicardia evocadas pelo aumento da pressão arterial em resposta à infusão intravenosa de fenilefrina antes e após tratamento do hipocampo dorsal com 1400W.

### **5.1.5. Efeitos do tratamento do hipocampo dorsal com L-NAME na função barorreflexa em ratos não anestesiados co-tratados localmente com NPLA + 1400W**

A microinjeção bilateral do inibidor não seletivo da NOS L-NAME (50nmol/500nL, n=6) no hipocampo dorsal de animais co-tratados localmente com NPLA (0,1nmol/500nL) + 1400W (0,02nmol/500nL) (L-NAME + NPLA + 1400W, n=6) não alterou os valores basais de FC ( $383 \pm 15$  vs  $403 \pm 29$  bpm;  $t = 0,5$ ,  $P > 0,05$ ) e PAM ( $106 \pm 3$  vs  $108 \pm 3$  mmHg;  $t = 0,48$ ,  $P > 0,05$ ), quando comparados com animais tratados com veículo+NPLA+1400W (n=6). Entretanto, a análise de regressão linear da atividade barorreflexa indicou que o tratamento do hipocampo com L-NAME+NPLA+1400W diminuiu a inclinação da linha de regressão para resposta de bradicardia evocada pelo aumento da PAM ( $-2,7 \pm 0,2$  vs  $-1,6 \pm 0,4$  bpm/mmHg;  $t = 2,5$ ,  $P < 0,03$ ), enquanto o ganho de taquicardia causada por diminuição da PAM não foi afetado ( $-2,1 \pm 0,2$  vs  $-2,0 \pm 0,2$  bpm/mmHg;  $t = 0,4$ ,  $P > 0,05$ ) (Fig. 8). A bradicardia máxima foi diminuída em animais tratados com L-NAME+NPLA+1400W ( $-96 \pm 8$  vs  $-64 \pm 9$  bpm,  $t = 2$ ,  $P < 0,05$ ), enquanto a taquicardia reflexa não foi diferente entre os grupos experimentais ( $75 \pm 15$  vs  $67 \pm 8$  bpm,  $t = 0,5$ ,  $P > 0,05$ ) (Fig. 8).

## ANIMAIS TRATADOS COM NPLA+1400W

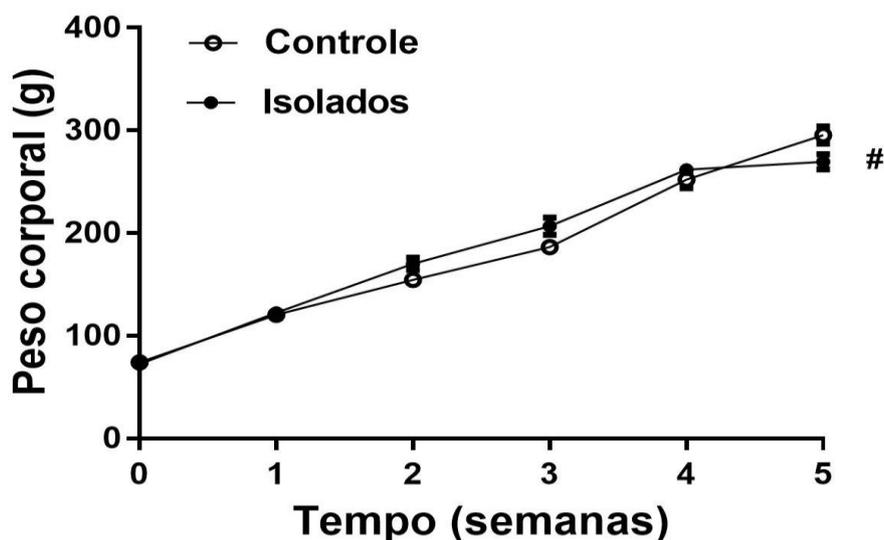


**Figura 8.** Análise de regressão linear da função barorreflexa correlacionando alteração da PAM ( $\Delta$ PAM) e resposta do reflexo da FC ( $\Delta$ FC) em animais que receberam microinjeção bilateral do inibidor não seletivo de NOS L-NAME ( $n=6$ ) ou veículo (solução fisiológica,  $n=6$ ) no hipocampo dorsal em animais co-tratados localmente com o inibidor seletivo de nNOS NPLA e com o inibidor seletivo do iNOS 1400W. **(ESQUERDA)** Curvas de regressão linear (superior) (veículo:  $r^2$  0.98; L-NAME:  $r^2$  0.98) e inclinação das linhas de regressão (ou seja, ganho) e resposta máxima (inferior) de taquicardia evocada pela diminuição da pressão arterial em resposta a intravenosa infusão de nitroprussiato de sódio em animais tratados com NPLA + 1400W e co-tratados com L-NAME (símbolos pretos) ou veículo (símbolos brancos) no hipocampo dorsal. **(DIREITA)** Curvas de regressão linear (superior) (veículo:  $r^2$  0.99; L-NAME:  $r^2$  0.90) e inclinação das linhas de regressão (ganho) e resposta máxima (inferior) de bradicardia evocadas pelo aumento da pressão arterial em resposta à infusão intravenosa de fenilefrina em animais tratados com NPLA + 1400W e co-tratados com L-NAME (símbolos pretos) ou veículo (símbolos brancos) no hipocampo dorsal.

## 5.2. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações cardiovasculares e comportamentais induzidas pelo isolamento social

### 5.2.1. Efeitos do estresse de isolamento social sobre o ganho de peso corporal

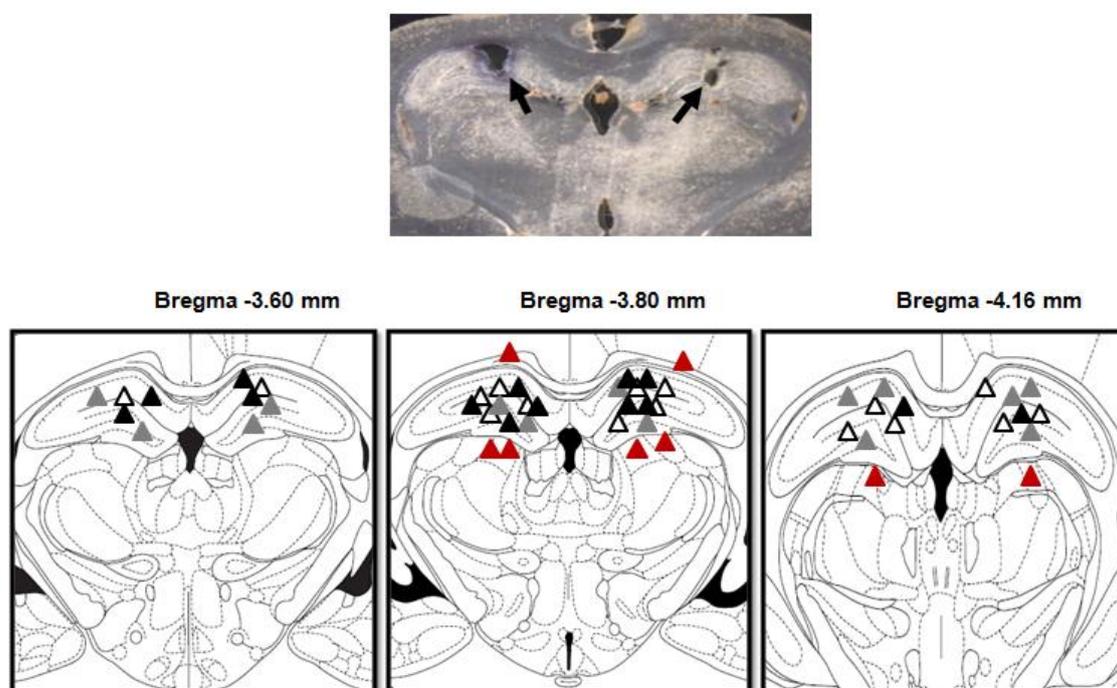
A análise da curva temporal de peso corporal indicou um efeito do estresse de isolamento social ( $F_{(1,25)} = 5,840$ ,  $P < 0,01$ ) e do tempo ( $F_{(1,25)} = 1610$ ,  $P < 0,0001$ ), bem como interação isolamento x tempo ( $F_{(1,25)} = 5,419$ ,  $P < 0,02$ ) (Fig. 9). A análise pós-teste revelou que o isolamento social reduziu o ganho do peso corporal nos animais na última semana de isolamento ( $P < 0,05$ ) (Fig. 9).



**Figura 9.** Curva temporal de peso corporal nos grupos controle (n=8) (círculos brancos) e estresse de isolamento social (n=8) (isolados, círculos pretos). Os círculos representam a média  $\pm$  EPM. #  $P < 0,05$  vs respectivo grupo controle. ANOVA bifatorial.

### 5.2.2. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações comportamentais induzidas pelo isolamento social

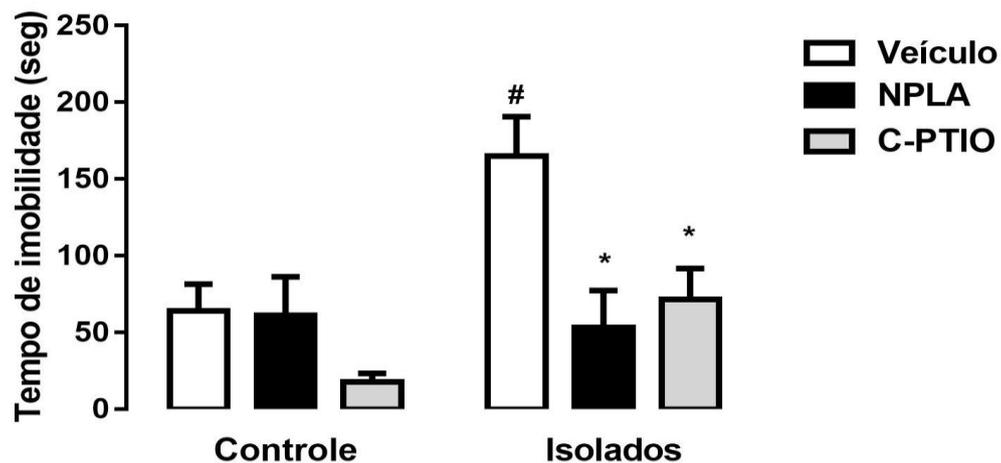
Fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro representando os sítios de microinjeção bilaterais no hipocampo dorsal de um animal representativo é apresentada na Figura 10. A Figura 10 também apresenta representações diagramáticas mostrando os sítios de microinjeção bilaterais no hipocampo dorsal de veículo, carboxy-PTIO e NPLA; bem como locais de microinjeção em estruturas ao redor do hipocampo dorsal.



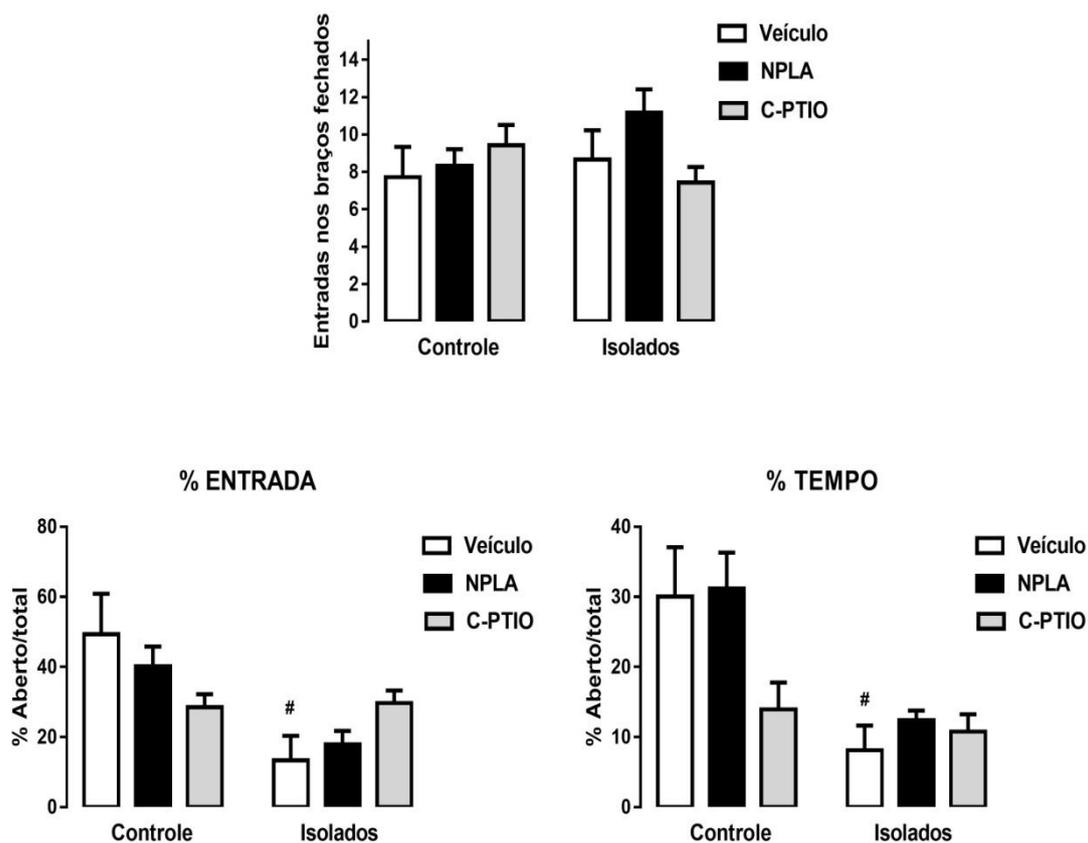
**Figura 10. (Superior)** Microfotografia de uma secção coronal do cérebro que mostra os locais de microinjeção bilateral no hipocampo dorsal de um animal representativo. As setas indicam os locais de microinjeção. **(Inferior)** Representações do diagrama modificadas do atlas do cérebro de rato de Paxinos e Watson (1997) indicando os locais de microinjeção bilaterais no hipocampo dorsal do veículo (triângulos abertos), NPLA (triângulos pretos), carboxy-PTIO (triângulos cinza); bem como locais de microinjeção nas estruturas circundantes do hipocampo dorsal (triângulos vermelhos).

A análise do tempo de imobilidade no teste de nado forçado indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,36)} = 8,17$ ,  $P < 0,007$ ) e do tratamento ( $F_{(2,36)} = 6,34$ ,  $P < 0,004$ ), bem como interação isolamento x tratamento ( $F_{(2,36)} = 3,41$ ,  $P < 0,04$ ) (Fig. 11). A análise pós-teste revelou que o isolamento aumentou o tempo de imobilidade nos grupos veículo ( $P < 0,05$ ), mas não nos animais tratados com NPLA ( $P > 0,05$ ) ou carboxy-PTIO ( $P > 0,05$ ) no hipocampo dorsal. Além disso, o tratamento com NPLA ( $P < 0,05$ ) ou carboxy-PTIO ( $P < 0,05$ ) diminuiu o tempo de imobilidade nos animais isolados (Fig. 11).

A análise de comportamentos relacionados à ansiedade no teste de labirinto em cruz elevado indicou que não houve efeito do isolamento ( $F_{(1,33)} = 0,3$ ,  $P > 0,05$ ), do tratamento ( $F_{(2,33)} = 0,8$ ,  $P > 0,05$ ) e interação isolamento x tratamento ( $F_{(2,33)} = 1,9$ ,  $P > 0,05$ ) no número de entradas nos braços fechados (Fig. 12). Em relação à porcentagem de entradas nos braços abertos, a análise indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,32)} = 13$ ,  $P < 0,0008$ ), e da interação isolamento x tratamento ( $F_{(2,32)} = 4,5$ ,  $P < 0,01$ ), porém sem efeito do tratamento ( $F_{(2,32)} = 0,08$ ,  $P > 0,05$ ). Em relação à porcentagem de tempo nos braços abertos, a análise indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,35)} = 15$ ,  $P < 0,004$ ), porém sem interação isolamento x tratamento ( $F_{(2,35)} = 2,4$ ,  $P > 0,05$ ) e do efeito do tratamento ( $F_{(2,35)} = 2$ ,  $P > 0,05$ ). A análise pós-teste revelou que o isolamento diminuiu a porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos nos animais tratados com veículo ( $P < 0,05$ ), mas não nos animais que receberam NPLA ou carboxy-PTIO no hipocampo dorsal (Fig. 12).



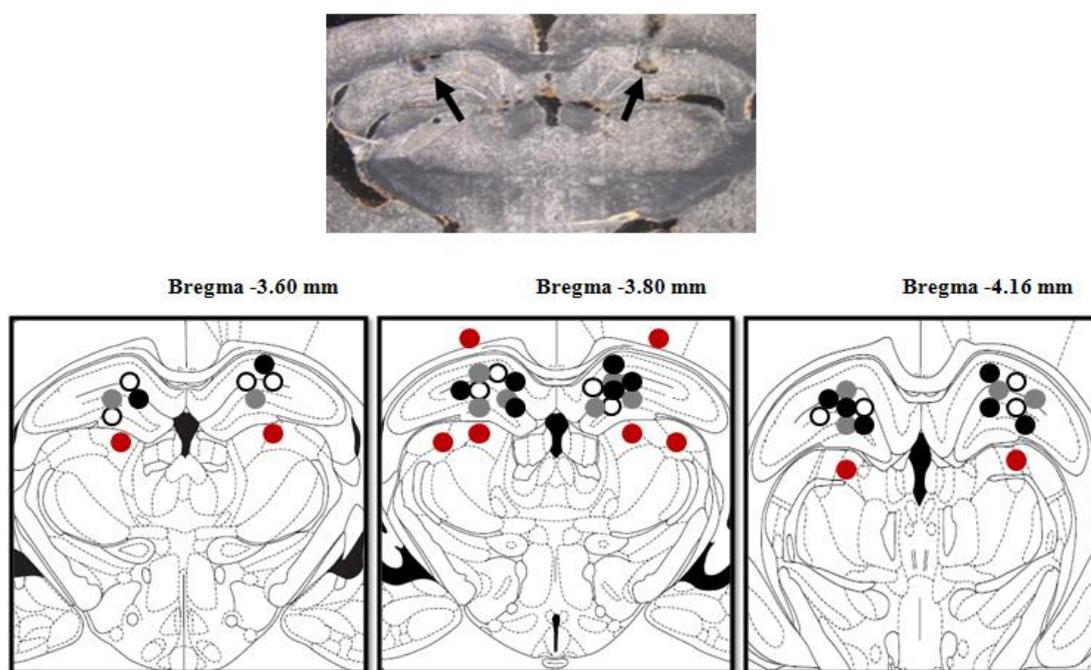
**Figura 11.** Tempo de imobilidade no teste de natação forçada nos grupos controle e isolados tratados com veículo (n=6) (barras brancas), NPLA (n=6) (barras pretas) ou carboxy-PTIO (n=7) (barras cinza) no hipocampo dorsal. O gráfico mostra o tempo de imobilidade total de 5 minutos durante a sessão do teste de nado forçado. As barras representam a média  $\pm$  EPM. #  $P < 0,05$  vs respectivo grupo controle. \*  $P < 0,05$  vs grupo de veículo respectivo no mesmo estado. ANOVA bifatorial seguido pelo pós-teste de Bonferroni.



**Figura 12.** Parâmetros analisados no teste do labirinto de cruz elevado nos grupos controle e isolados tratados com veículo (n=6) (barras brancas), NPLA (n=6) (barras pretas) ou carboxy-PTIO (n=7) (barras cinza). Parâmetros determinados em teste de 5 minutos no labirinto de cruz elevado. As barras representam a média  $\pm$  EPM. #  $P < 0,05$  vs respectivo grupo controle. ANOVA bifatorial seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.2.3. Estudo do envolvimento da neurotransmissão nitrérgica do hipocampo dorsal nas alterações cardiovasculares induzidas pelo isolamento social

Fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro representando os sítios de microinjeção bilaterais no hipocampo dorsal de um animal representativo é apresentada na Figura 13. A Figura 13 também apresenta representações diagramáticas mostrando os sítios de microinjeção bilaterais no hipocampo dorsal de veículo, carboxy-PTIO e NPLA; bem como locais de microinjeção em estruturas ao redor do hipocampo dorsal.



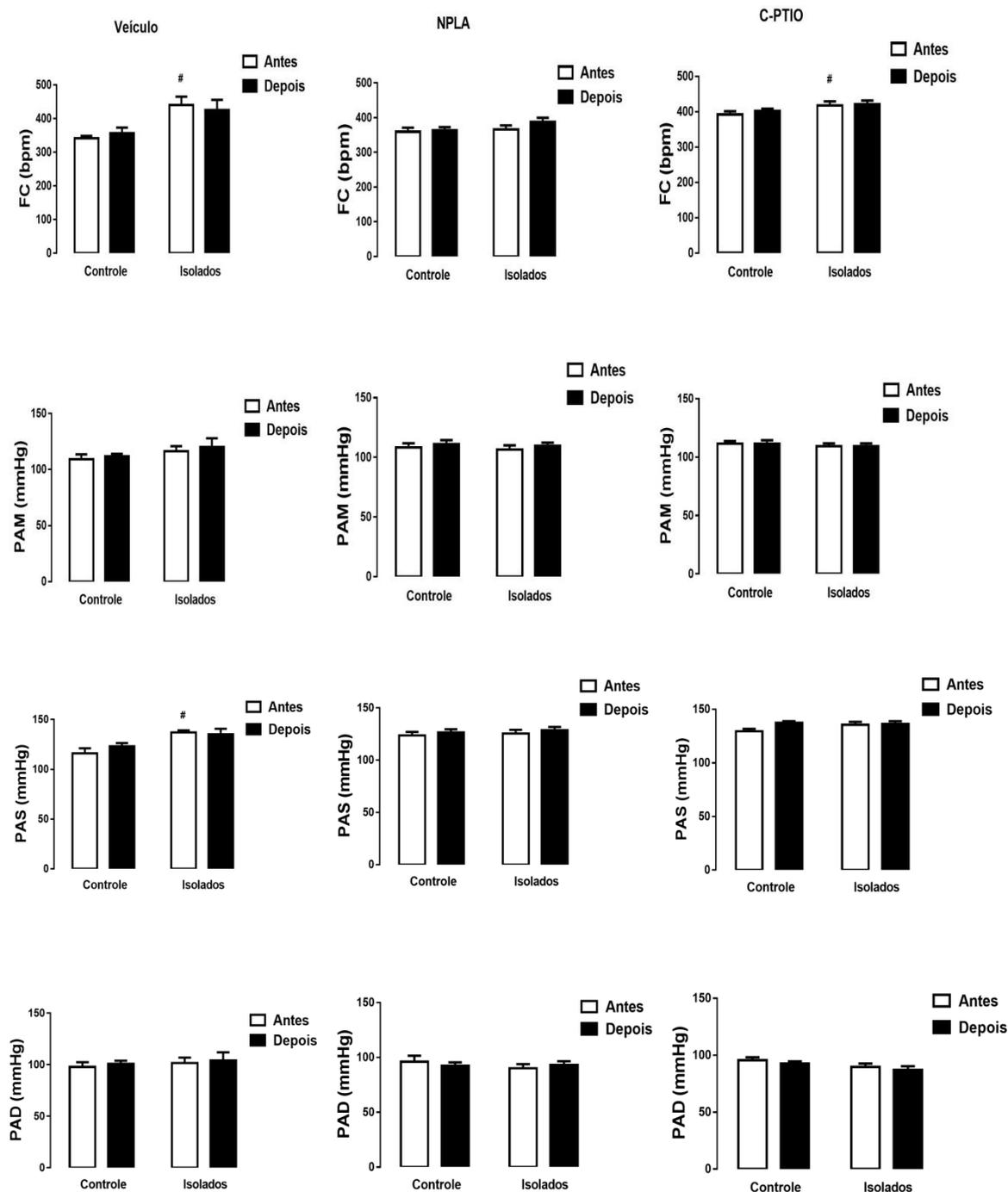
**Figura 13. (Superior)** Microfotografia de uma secção coronal do cérebro que mostra os locais de microinjeção bilateral no hipocampo dorsal de um animal representativo. As setas indicam os locais de microinjeção. **(Inferior)** Representações do diagrama modificadas do atlas do cérebro de rato de Paxinos e Watson (1997) indicando os locais de microinjeção bilaterais no hipocampo dorsal do veículo (círculos abertos), NPLA (círculos pretos), carboxy-PTIO (círculos cinza); bem como locais de microinjeção nas estruturas circundantes do hipocampo dorsal (círculos vermelhos).

A análise dos parâmetros cardiovasculares basais dos animais tratados no hipocampo dorsal com veículo indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,22)} = 16,86$ ,  $P < 0,0005$ ), porém sem interação entre os fatores ( $F_{(1,22)} = 0,55$ ,  $P > 0,05$ ) e efeito do tratamento ( $F_{(1,22)} = 0,00$ ,  $P > 0,05$ ) para os valores de FC. A análise da PAS indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,21)} = 15,39$ ,  $P < 0,0008$ ), porém sem interação entre os fatores ( $F_{(1,21)} = 1,0$ ,  $P > 0,05$ ) e efeito do tratamento ( $F_{(1,21)} = 0,35$ ,  $P > 0,05$ ). A análise da PAD não indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,20)} = 0,4337$ ,  $P > 0,05$ ) e do tratamento ( $F_{(1,20)} = 0,28$ ,  $P > 0,05$ ), nem interação entre os fatores ( $F_{(1,20)} = 0,00$ ,  $P > 0,05$ ). A análise da PAM não indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,19)} = 2,545$ ,  $P > 0,05$ ) e do tratamento ( $F_{(1,19)} = 0,46$ ,  $P > 0,05$ ), nem interação entre os fatores ( $F_{(1,19)} = 0,01$ ,  $P > 0,05$ ). As análises pós-teste não revelaram efeito do isolamento ou do tratamento do hipocampo dorsal com veículo nos valores basais de FC ( $P > 0,05$ ), PAS ( $P > 0,05$ ), PAD ( $P > 0,05$ ) ou PAM ( $P > 0,05$ ) (Fig. 14).

A análise dos parâmetros cardiovasculares basais dos animais tratados no hipocampo dorsal com NPLA não indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,32)} = 1,841$ ,  $P > 0,05$ ) e ou do tratamento ( $F_{(1,32)} = 1,219$ ,  $P > 0,05$ ), nem interação tratamento x isolamento ( $F_{(1,32)} = 0,508$ ,  $P > 0,05$ ) para os valores de FC. A análise da PAS também não indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,31)} = 0,3434$ ,  $P > 0,05$ ) ou do tratamento ( $F_{(1,31)} = 0,7422$ ,  $P > 0,05$ ), nem interação tratamento x isolamento ( $F_{(1,31)} = 0,003$ ,  $P > 0,05$ ). A análise da PAD também não indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,33)} = 0,3932$ ,  $P > 0,05$ ) ou do tratamento ( $F_{(1,33)} = 0,0120$ ,  $P > 0,05$ ) nem interação tratamento x isolamento ( $F_{(1,33)} = 0,5654$ ,  $P > 0,05$ ). A análise da PAM não indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,34)} = 0,2589$ ,  $P > 0,05$ ) ou do tratamento ( $F_{(1,34)} = 0,9185$ ,  $P > 0,05$ ), nem interação do tratamento x isolamento ( $F_{(1,34)} = 0,002$ ,  $P > 0,05$ ). As análises pós-teste não revelaram efeito do isolamento ou do tratamento do hipocampo dorsal com NPLA nos valores basais de FC ( $P > 0,05$ ), PAS ( $P > 0,05$ ), PAD ( $P > 0,05$ ) ou PAM ( $P > 0,05$ ) (Fig. 14).

A análise dos parâmetros cardiovasculares basais dos animais tratados no hipocampo dorsal com carboxy-PTIO indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,25)} = 4,480$ ,  $P < 0,04$ ), mas sem interação do tratamento x isolamento ( $F_{(1,25)} = 0,1148$ ,  $P > 0,05$ ) ou efeito do tratamento ( $F_{(1,25)} = 0,4448$ ,  $P > 0,05$ ), para os valores de FC. A análise da PAS não indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,27)} = 0,9954$ ,  $P > 0,05$ ), nem interação do tratamento x isolamento ( $F_{(1,27)} = 2,003$ ,  $P > 0,05$ ) ou efeito do tratamento ( $F_{(1,31)} = 2,874$ ,  $P > 0,05$ ). A análise da PAD não indicou o efeito do isolamento ( $F_{(1,29)} = 3,737$ ,  $P > 0,05$ ), nem

interação do tratamento x isolamento ( $F_{(1,29)} = 0,000$ ,  $P > 0,05$ ) ou efeito do tratamento ( $F_{(1,29)} = 0,9341$ ,  $P > 0,05$ ). A análise da PAM também não indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,32)} = 0,7986$ ,  $P > 0,05$ ), nem interação do tratamento x isolamento ( $F_{(1,32)} = 0,0115$ ,  $P > 0,05$ ) ou efeito do tratamento ( $F_{(1,32)} = 0,000$ ,  $P > 0,05$ ). As análises pós-teste não revelaram efeito do isolamento ou do tratamento do hipocampo dorsal com carboxy-PTIO nos valores basais de FC ( $P > 0,05$ ), PAS ( $P > 0,05$ ), PAD ( $P > 0,05$ ) ou PAM ( $P > 0,05$ ) (Fig. 14).

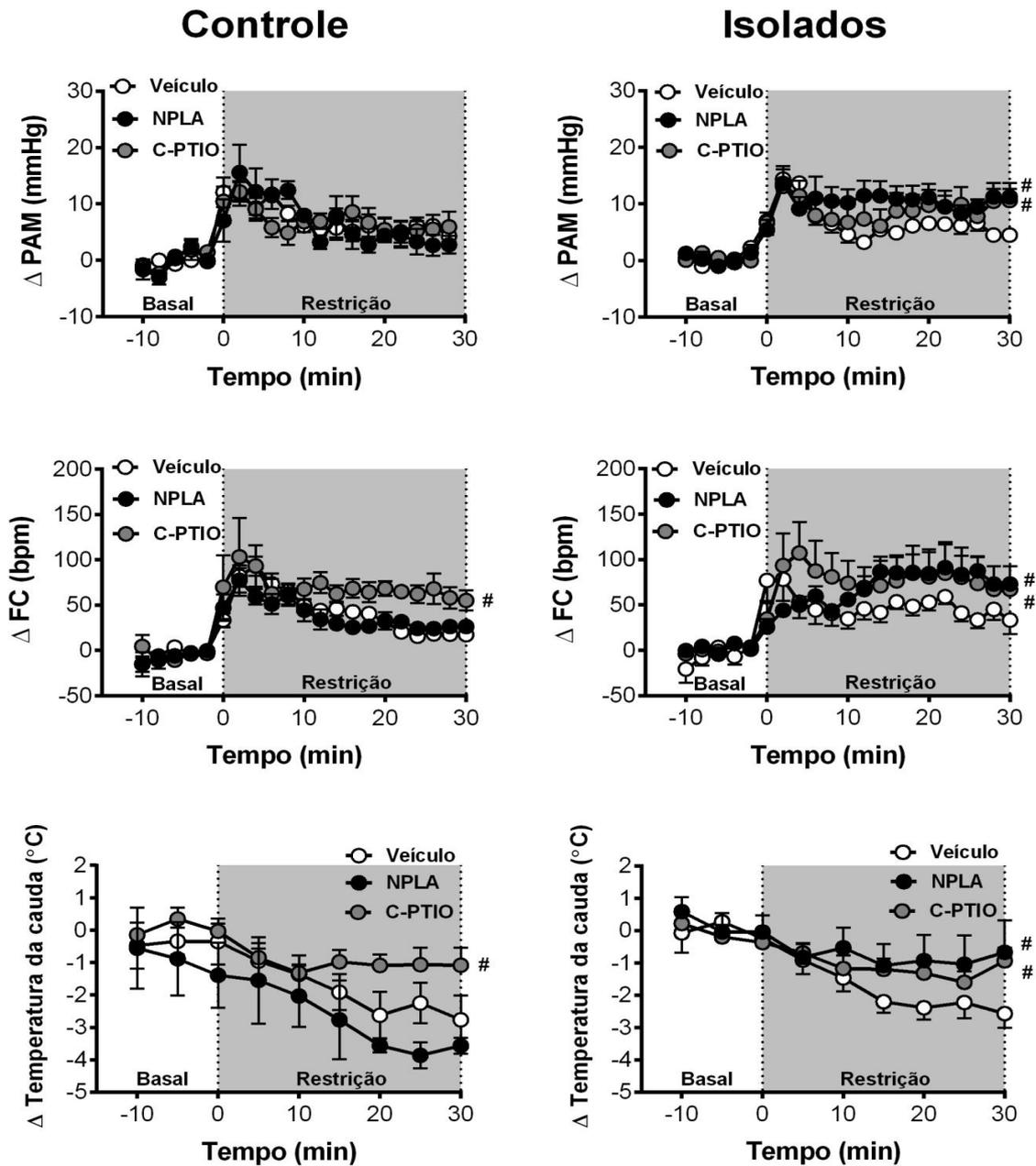


**Figura 14.** Frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) nos grupos controle e isolados tratados com veículo (n=7), NPLA (n=8) e carboxy-PTIO (n=7), antes do tratamento (barras brancas), e depois do tratamento (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM. #  $P < 0.05$  vs respectivo grupo controle. ANOVA bifatorial seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

A análise das curvas temporais de alteração da PAM induzida pelo estresse por restrição em animais controle e isolados indicou efeito do tempo ( $F_{(20,600)} = 35$ ,  $P < 0,001$ ), porém sem efeito do tratamento ( $F_{(2,30)} = 0,3$ ,  $P > 0,05$ ) e do isolamento ( $F_{(1,30)} = 1,8$ ,  $P > 0,05$ ). A análise também indicou interação tempo x isolamento ( $F_{(20,600)} = 2,78$ ;  $P < 0,05$ ) e tempo x tratamento ( $F_{(40,600)} = 1,49$ ;  $P < 0,05$ ), mas não isolamento x tratamento ( $F_{(2,30)} = 0,62$ ;  $P > 0,05$ ), na resposta de PAM (Fig. 15).

A análise das curvas temporais de alteração da FC induzida pelo estresse por restrição em animais controle e isolados indicou efeito do tempo ( $F_{(20, 600)} = 23$ ,  $P < 0,001$ ), porém sem efeito do tratamento ( $F_{(2,30)} = 1,6$ ,  $P > 0,05$ ) e do isolamento ( $F_{(1,30)} = 1,1$ ,  $P > 0,05$ ). A análise também indicou interação tempo x isolamento ( $F_{(20,600)} = 3,3$ ;  $P < 0,05$ ), mas sem interação isolamento x tratamento ( $F_{(2,30)} = 0,23$ ;  $P > 0,05$ ) e tempo x tratamento ( $F_{(40,600)} = 0,91$ ;  $P > 0,05$ ) (Fig. 15).

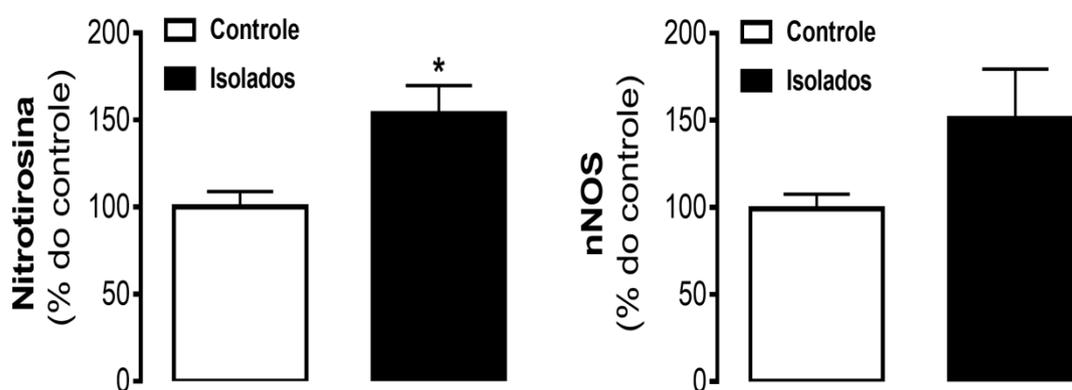
A análise das curvas temporais de alteração da temperatura cutânea da cauda induzida pelo estresse por restrição em animais controle e isolados indicou efeito do tempo ( $F_{(8,280)} = 19,2$   $P < 0,001$ ), porém sem efeito do tratamento ( $F_{(2,35)} = 1,4$ ,  $P > 0,05$ ) e do isolamento ( $F_{(1,35)} = 2,5$ ,  $P > 0,05$ ). A análise não indicou interação isolamento x tratamento ( $F_{(2,35)} = 2,62$ ;  $P > 0,05$ ), tempo x isolamento ( $F_{(8,280)} = 0,57$ ;  $P > 0,05$ ) ou tempo x tratamento ( $F_{(16,280)} = 1,10$ ;  $P > 0,05$ ) (Fig. 15).



**Figura 15.** Curvas de evolução temporal da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cauda ( $\Delta$  temperatura da cauda) evocadas pelo estresse agudo de restrição em animais tratado bilateralmente no hipocampo dorsal com veículo (salina, 500nL, n=6), carboxy-PTIO (2nmol/500nL, n=6) e NPLA (0.1 nmol/500 nL, n=6). O início do estresse foi em t = 0. Círculos representam à média e as barras EPM. # P < 0,05 durante todo o período de restrição em comparação com o grupo veículo, ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

#### **5.2.4. Efeito do estresse de isolamento social na expressão da nNOS e dos níveis de nitrotirosina no hipocampo dorsal**

A exposição ao estresse de isolamento social durante 5 semanas aumentou os níveis de nitrotirosina no hipocampo dorsal em relação ao grupo controle ( $100,0 \pm 8,915$  n=5 vs.  $153,8 \pm 15,98$  n=7;  $t = 2,616$ ,  $P < 0,02$ ). Entretanto, o isolamento social não afetou a expressão da nNOS no hipocampo dorsal ( $99,22 \pm 8,410$  n=9 vs.  $153,4 \pm 27,98$  n=8;  $t = 1,952$ ,  $P > 0,06$ ) (Fig. 16).



**Figura 16.** Expressão da nNOS e dos níveis de nitrotirosina no hipocampo dorsal em animais controle (n=9) (barras brancas) e animais sujeitos a 5 semanas de isolamento social (n=9) (barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  vs respectivo grupo controle. Teste  $t$  de Student.

## 6. DISCUSSÃO

A Tabela 1 sumariza os achados com relação ao papel da neurotransmissão nitrérgica no hipocampo dorsal no controle da atividade barorreflexa em condições fisiológicas. A nNOS e iNOS promove uma inibição parassimpática e a eNOS promove uma facilitação parassimpática e ainda a iNOS promove uma facilitação simpática no controle da atividade barorreflexa. Com relação às respostas comportamentais e cardiovasculares ao estresse de isolamento social, nós observamos que o tratamento do hipocampo dorsal com NPLA ou carboxy-PTIO não reverteu os efeitos ansiogênicos no labirinto em cruz elevado, mas reverteu o comportamento relacionado à depressão identificado no teste de nado forçado. Além disso, nós observamos que o tratamento com carboxy-PTIO, mas não com NPLA, facilitou a resposta de aumento de FC e diminuiu a resposta de queda da temperatura cutânea da cauda desencadeadas pelo estresse de restrição agudo nos animais controle. Nos animais isolados tanto o tratamento do hipocampo dorsal com NPLA quanto carboxy-PTIO facilitaram as respostas de aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, e reduziu a resposta da temperatura cutânea da cauda induzidas pelo estresse de restrição agudo. O isolamento aumentou os níveis de nitrotirosina no hipocampo dorsal, e houve uma tendência de aumento (53% de aumento) nos níveis proteicos da nNOS.

**Tabela 1.** Resumo do papel da nNOS, iNOS e eNOS no hipocampo dorsal no controle das respostas de FC do barorreflexo.

	nNOS	iNOS	eNOS
<b>Bradycardia reflexa</b>	↓	↓	↑
<b>Taquicardia reflexa</b>	--	↑	--

A bradicardia reflexa refere-se à diminuição da FC provocada pelo aumento da pressão arterial na resposta à infusão intravenosa de fenilefrina. A taquicardia reflexa é o aumento da FC provocada pela diminuição da pressão arterial, evocada pela infusão intravenosa de nitroprussiato de sódio. Setas para cima ou para baixo indicam papel facilitatório ou inibitório, respectivamente.

### **6.1. Neurotransmissão nitrérgica no hipocampo dorsal e a atividade do barorreflexo**

O presente estudo fornece a primeira evidência de que a neurotransmissão nitrérgica no hipocampo modula a função barorreflexa. Estudos anteriores forneceram evidências de que a ativação da nNOS no sistema nervoso central está envolvida nas respostas barorreflexas. Por exemplo, o tratamento sistêmico com inibidores preferenciais da nNOS modulou a bradicardia reflexa causada por aumento da pressão arterial (Murakami et al., 1998; Almeida et al., 2015), mas sem afetar o controle barorreflexo da atividade nervosa simpática renal (Murakami et al., 1998). O papel da nNOS na função barorreflexa também foi evidenciado por estudos realizados em camundongos knockout nNOS (nNOS<sup>-/-</sup>) (Carvalho et al., 2006). Estruturas do tronco encefálico, como o núcleo do trato solitário (NTS) e o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (Talman e Dragon, 2004; Mayorov, 2005; Lin et al., 2012), bem como regiões telencefálicas como o córtex pré-frontal medial (Resstel et al., 2006) e o núcleo do leito estria terminal (NLET) (Alves et al., 2009) foram relatados como locais onde a nNOS é ativada para modulação de respostas barorreflexas. Com relação à eNOS, essa isoforma foi proposta como uma fonte de NO regulando a função barorreflexa em estruturas bulbares como o NTS e o RVLM (Kishi et al., 2003; Waki et al., 2003). No entanto, um papel da eNOS no controle da função barorreflexa em estruturas supra-bulbares nunca foi documentado. Em relação à iNOS, até onde sabemos, os resultados do presente estudo constituem o primeiro achado indicando uma influência dessa isoforma da NOS no controle de respostas barorreflexas.

Ferreira-Junior et al., (2017) relataram recentemente que a inibição aguda da neurotransmissão no hipocampo dorsal causada pelo tratamento local com o bloqueador sináptico não-seletivo CoCl<sub>2</sub> aumentou a taquicardia durante diminuição da pressão arterial e a resposta de bradicardia evocada pelo aumento da pressão arterial. Estes resultados indicaram uma influência inibitória do hipocampo dorsal nas respostas reflexas durante alterações da pressão arterial (Ferreira-Junior et al., 2017). Portanto, a facilitação da bradicardia reflexa após o tratamento do hipocampo com inibidores seletivos da nNOS ou da iNOS sugere que a neurotransmissão nitrérgica local pode ser um mecanismo envolvido no controle inibitório hipocampal da função barorreflexa. No entanto, a influência facilitatória da iNOS na taquicardia reflexa e da eNOS na

bradicardia reflexa parece contrapor outros mecanismos neuroquímicos locais que inibem as respostas barorreflexas.

A nNOS é proposta como a principal isoforma envolvida na síntese de NO no sistema nervoso central (Ikeda et al., 2004; Garthwaite, 2008; Zhou et al., 2009). O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  após a ativação do receptor de glutamato NMDA é o mecanismo mais bem caracterizado para a ativação da nNOS no sistema nervoso central (Prast e Philippu, 2001; Guix et al., 2005; Garthwaite, 2008). No entanto, um estudo recente relatou que o tratamento do hipocampo dorsal com um antagonista seletivo do receptor NMDA diminuiu as respostas cardíacas do barorreflexo (Ferreira-Junior et al., 2018). Em conjunto com os resultados descritos aqui, esses achados indicam um papel oposto da nNOS (inibitório) e do receptor NMDA (facilitador) no hipocampo no controle da função barorreflexa. Portanto, o controle da função barorreflexa pela nNOS no hipocampo parece ser independente de uma interação com a neurotransmissão glutamatérgica local. No entanto, não podemos excluir a possibilidade de que a nNOS seja ativada em resposta à ativação do receptor NMDA, mas uma vez liberado o NO interage com outros mecanismos neuroquímicos hipocampais para controlar a atividade barorreflexa.

Como mencionado acima, várias evidências indicam a expressão constitutiva da iNOS no sistema nervoso central (para revisão, ver Amitai, 2010). Nesse sentido, a iNOS foi identificada no hipocampo em circunstâncias basais (Pinnock et al., 2007; Adachi et al., 2010; Montezuma et al., 2012). Células gliais, especialmente astrócitos, microglias e macroglias, foram identificados como células que expressam iNOS, e uma fonte de NO no sistema nervoso central (Amitai, 2010). Portanto, o NO derivado de iNOS tem sido proposto como um mecanismo neuroquímico envolvido na interação neuronal-astrócito (Buskila et al., 2005; Buskila et al., 2010; Amitai, 2010). Nesse sentido, a ativação de receptores metabotrópicos de glutamato e receptores purinérgicos (P2Y) foram relatados como um estimulador da liberação de NO a partir de astrócitos (Ikeda et al., 2004; Mehta et al., 2008). Por sua vez, o NO derivado dos astrócitos facilita a liberação de glutamato (Amitai, 2010). Assim, identificou-se que a iNOS está envolvida na potenciação de potenciais pós-sinápticos excitatórios evocados eletricamente e na potenciação sináptica (Amitai, 2010). No entanto, como dito acima, o glutamato desempenha um papel oposto no controle do barorreflexo em relação à iNOS (Ferreira-Junior et al., 2018). Portanto, como no caso da nNOS, o controle da função

barorreflexa pela iNOS hipocampal possivelmente está relacionado a uma interação com outros mecanismos que não a neurotransmissão glutamatérgica local.

Nossos achados indica um papel da eNOS hipocampal no controle da bradicardia barorreflexa são apoiados por evidências de que uma liberação tônica de NO da eNOS modula a atividade sináptica no hipocampo (Hopper et al., 2006). Apesar de algumas evidências da presença da eNOS em astrócitos (Doyle et al., 1997; Cho et al., 2005), resultados por imunocitoquímica e hibridização *in situ* (Seidel et al., 1997; Stanarius et al., 1997; Blackshaw et al., 2003) apoiaram a proposição de que as células endoteliais constituem a principal localização da eNOS no hipocampo (Hopper et al., 2006; Garthwaite, 2008). Esta ideia é ainda apoiada por evidências de que a eNOS no encéfalo é encontrada nos capilares (Seidel et al., 1997; Stanarius et al., 1997), que estão muito próximos das células neuronais e gliais (Pawlik et al., 1981). Além disso, a geração de NO tônico da parede capilar é, teoricamente, um mecanismo eficaz para suprir as células parênquimas com níveis de NO fisiologicamente significativos (Tsoukias et al., 2003). Portanto, a modulação da função barorreflexa pela eNOS no hipocampo provavelmente está relacionada à comunicação neurovascular através de uma liberação tônica de NO (Garthwaite, 2008).

A eNOS foi demonstrada como uma fonte de NO tônico de baixo nível no hipocampo, enquanto a nNOS está relacionada com a modulação fásica da transmissão sináptica ao longo da liberação de maior concentração de NO (Hopper et al., 2006). Como mencionado acima, estudos anteriores forneceram evidências de uma influência facilitatória da neurotransmissão glutamatérgica hipocampal no controle da função barorreflexa (Ferreira-Junior et al., 2018). No entanto, inversamente, a ativação dos receptores GABA no hipocampo inibe as respostas de FC do barorreflexo (Ferreira-Junior et al., 2018). Em conjunto, esses resultados fornecem evidências de que o baixo nível tônico de NO oriundo da eNOS pode facilitar a bradicardia reflexa via modulação da liberação de glutamato. Por outro lado, a modulação similar da função barorreflexa pela nNOS, iNOS e o receptor GABA<sub>A</sub> no hipocampo, juntamente com a evidência de que o NO estimula a liberação de GABA no hipocampo (Prast e Philippu, 2001), sugere que níveis mais elevados de NO liberados a partir da nNOS e iNOS interage com a neurotransmissão GABAérgica local para inibir as respostas do reflexo da FC durante o aumento da pressão arterial. No entanto, considerando que o NO também age em neurônios pós-sinápticos diretamente despolarizando e hiperpolarizando esses neurônios

(Prast e Philippu, 2001; Garthwaite, 2008), uma possibilidade adicional é que o NO modula a atividade barorreflexa por meio de mecanismos independentes de interações com outros mecanismos neuroquímicos locais. De qualquer forma, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos locais envolvidos na modulação da função barorreflexa pelas diferentes isoformas de NOS dentro do hipocampo.

O hipocampo não possui projeções diretas para estruturas bulbares envolvidas com o controle tônico da atividade autonômica (Ulrich-Lai et al., 2009; Myers, 2017). O controle da atividade autonômica pelo hipocampo é proposto ser mediado por conexões com estruturas intermediárias, como o NLET, a área pré-óptica medial (mPOA) e a área hipotalâmica lateral; que, por sua vez, se projetam para neurônios efetores autonômicos no tronco cerebral (por exemplo, núcleo motor dorsal do vago e núcleo ambíguo) e coluna celular intermediolateral (IML) (Myers, 2017). Assim, o controle da função barorreflexa por mecanismos nitrérgicos no hipocampo possivelmente está relacionado a conexões indiretas com estruturas de projeção ao tronco cerebral e IML (Ulrich-Lai et al., 2009; Myers, 2017). Assim, estudos anteriores relataram que estruturas que recebem aferências do hipocampo como o NLET, hipotálamo lateral e mPOA, desempenham um papel no controle das funções do barorreflexo (Inui et al., 1995; Crestani et al., 2008; Crestani et al., 2009). No entanto, mais estudos são necessários para investigar o circuito envolvido no controle hipocampal da função barorreflexa.

## **6.2. Neurotransmissão nitrérgica no hipocampo dorsal e as respostas comportamentais e cardiovasculares ao isolamento social**

Tem sido demonstrado que os efeitos do estresse de isolamento social só são completamente observados se o protocolo é iniciado durante a adolescência (Fone e Porkess, 2008; Crestani, 2017). Nesse sentido, a ontogenia é proposta como um fator importante que afeta as respostas ao estresse (McCormick et al, 2010; Crestani, 2017). Foi proposto que humanos adolescentes experimentam mais eventos estressores e eventos negativos do que seus pares adultos (Buchanan et al., 1992). Estudos em animais também evidenciaram que os adolescentes são vulneráveis às consequências somáticas, comportamentais, neuroendócrinas e cardiovasculares aos protocolos de estresse crônico (Stone e Quartermain, 1997; Doremus-Fitzwater et al., 2009; Jankord et al., 2011; Duarte et al., 2015), incluindo o isolamento social (Fone e Porkess, 2008;

Cruz et al., 2016). A vulnerabilidade de animais adolescentes para os efeitos do isolamento social está possivelmente relacionada ao fato dessa fase ontogênica constituir um período de grande contato social que contribui para o desenvolvimento (Spear, 2000; Buwalda et al., 2011; Crestani, 2017). De fato, vários estudos reportaram que o estresse social durante a adolescência evoca numerosas mudanças comportamentais e neuroplasticidade que persistem até a idade adulta (Fone e Porkess, 2008; Buwalda et al., 2011). Com relação às respostas cardiovasculares ao isolamento social, apesar das evidências de vulnerabilidade dos ratos adolescentes às respostas de aumento da pressão arterial e de alteração da sensibilidade do barorreflexo, essas alterações não perduraram até a idade adulta (Cruz et al., 2016). Baseado nessas evidências, nós definimos o protocolo de isolamento social no qual os animais foram mantidos em isolamento durante todo o período da adolescência, que em roedores é definido como o período entre a idade de 21 a 60 dias de idade (Tirelli et al., 2003; McCormick et al., 2010; Crestani, 2017).

O presente estudo mostrou que 5 semanas de isolamento social alterou os parâmetros basais de FC, tanto nos animais veículos como nos animais tratados com microinjeção bilateral no hipocampo dorsal de carboxy-PTIO, mas não no grupo isolado NPLA e sem alteração da PAM nesses animais. Um estudo também não observou alterações na FC em ratos Wistar adolescente com 28 dias e adultos com 60 dias expostos ao isolamento social durante 3 semanas (Cruz et al., 2015). Entretanto, houve aumento da PAM em animais adolescentes submetidos ao isolamento social, porém sem alteração nos animais adultos (Cruz et al., 2015). Observou-se também um aumento da FC de repouso em ratas expostas ao isolamento social durante 4 semanas, que foi acompanhado por uma redução da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e um aumento da atividade simpática e uma diminuição da atividade parassimpática (Knox et al., 1998; Grippo et al., 2007). A discrepância dos presentes achados com dados anteriores com relação aos efeitos sobre parâmetros basais de pressão arterial e FC não estão claros, mas podem decorrer de diferenças no tempo de isolamento, bem como nos protocolos experimentais. Além disso, em nenhum dos estudos anteriores os animais foram sujeitos ao implante de cânulas no encéfalo. Entretanto, estudos futuros são necessários para esclarecer as discrepâncias.

Em relação ao controle do hipocampo dorsal na função cardiovascular basal, os dados do presente estudo não indicaram uma participação da neurotransmissão

nitrérgica no hipocampo dorsal na manutenção tônica dos parâmetros basais de FC e pressão arterial. Esses achados corroboram com dados de estudos anteriores que não identificaram efeitos do tratamento do hipocampo dorsal com inibidor sináptico não-seletivo (CoCl<sub>2</sub>), antagonistas de receptores glutamatérgicos e GABAérgicos ou inibidores da nNOS e sequestradores de NO sobre parâmetros cardiovasculares basais (Moraes-Neto et al., 2014; Ferreira-Junior et al., 2017; Ferreira-Junior et al., 2018).

Os dados do presente estudo indicaram que os animais isolados tiveram um menor ganho de peso corporal em relação ao grupo controle. Esse achado corrobora com os dados de outros estudos que identificaram menor ganho de peso corporal após a exposição ao isolamento social (Cruz et al., 2016), bem como a outros protocolos de estresse crônico (Jankord et al., 2011; Flak et al., 2011; Almeida et al., 2015). Entretanto, os nossos achados contrastam com outros estudos que reportaram ausência de alteração no ganho de peso corporal em relação ao grupo controle em ratos e camundongos expostos a estressores crônicos (Grippe et al., 2002, 2006; Isingrini et al., 2011). Apesar desses dados discrepantes, é bem descrito na literatura que o estresse crônico diminui o ganho de peso corporal (Willner, 2005; Doremus-Fitzwater et al., 2009; Jankord et al., 2011), o que suporta os nossos achados.

O isolamento social promove o aumento da liberação do hormônio adrenocorticotropina (ACTH) e corticosterona (Weiss et al., 2004), nos quais podem estar envolvidos na resposta de redução do ganho de peso corporal. Além disso, foi reportado que o isolamento social pode regular negativamente o sistema hipotalâmico contendo transcritos relacionados à anfetamina e cocaína (CART) (Nakhate et al., 2011). Esse neurotransmissor está envolvido na regulação de diversos processos biológicos, incluindo ingestão de alimentos, manutenção do peso corporal, recompensa e dependência, resposta ao estresse, efeitos psicoestimulantes e nas funções endócrinas, que por sua vez pode levar a aumento na ingestão de alimentos e peso corporal (Rogge et al., 2008; Nakhate et al., 2011; Subhedar et al., 2014). Desse modo, uma regulação negativa dos efeitos do CART pode estar relacionado com os efeitos do isolamento social em reduzir o ganho de peso corporal.

Em relação às respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo, os nossos dados obtidos nos animais controle indicaram que o NO no hipocampo dorsal, possivelmente de outras fontes já que o inibidor da isoforma nNOS não teve efeito nos

animais controle; tem uma ação inibitória sobre a resposta de aumento da FC, além de facilitar a vasoconstrição cutânea mediada pela ativação simpática. Os dados sobre a temperatura cutânea corroboram com dados anteriores, que indicaram uma modulação facilitatória da neurotransmissão nitrérgica sobre a resposta vascular cutânea induzida por estressores condicionados e não-condicionados (Morais-Neto et al., 2014; Fabri et al., 2014). Entretanto, o efeito sobre a FC não corrobora com estudos anteriores, que reportaram que a microinjeção de NPLA ou carboxy-PTIO no hipocampo dorsal diminuiu as respostas de aumento da pressão arterial e FC induzidas pelo estresse de restrição (Morais Neto et al., 2014). Outro estudo também mostrou o mesmo resultado em relação às respostas de aumento da pressão arterial e FC induzidas pelo medo condicionado ao contexto (Fabri et al., 2014). As razões para as discrepâncias com relação aos dados anteriores não estão claras. Entretanto, é importante notar que as variações de FC induzidas pelo estresse de restrição no presente estudo (~50 bpm de aumento nos animais controle) foram relativamente menores do que aquelas identificadas no estudo anterior (~100 bpm de aumento nos animais controle) que identificou participação facilitatória da neurotransmissão nitrérgica no hipocampo dorsal (Morais-Neto et al., 2014). Desse modo, uma possibilidade é que respostas menores facilitaram a identificação de uma facilitação da resposta de aumento da FC após o tratamento farmacológico do hipocampo dorsal. Entretanto, estudos futuros são necessários para esclarecer as razões que explicam as discrepâncias dos nossos achados com aqueles de estudos anteriores. Durante o estresse de restrição os animais isolados que receberam a microinjeção de NPLA e carboxy-PTIO no hipocampo dorsal tiveram um aumento mais acentuado da PAM e FC. Apesar de nós não termos identificado um efeito do isolamento social nas respostas cardiovasculares ao estresse de restrição, esses dados sugerem que a neuromodulação do NO através da nNOS no hipocampo dorsal constitui um importante mecanismo recrutado pelo isolamento social que pode inibir respostas cardiovasculares exacerbadas durante o estresse em animais sujeitos ao isolamento social. Já foi mostrado que o estresse de isolamento em animais adolescente produz algumas respostas cardiovasculares compensatórias como forma de proteger o organismo do animal em situações aversivas (Cruz et al., 2016). Os achados atuais indicam que a ativação da nNOS e a consequente liberação de NO no hipocampo dorsal pode constituir um importante mecanismo envolvido na geração dessas respostas compensatórias. Entretanto, o tratamento do hipocampo dorsal com NPLA ou carboxy-PTIO reduziu as alterações induzidas pelo estresse de restrição na temperatura cutânea

da cauda, o que indica uma modulação facilitatória na atividade de neurônios cardiomotores simpáticos da coluna vertebral e neurônios simpáticos que controlam o tônus vascular cutâneo (Morais-Neto et al., 2014). Desse modo, o recrutamento da neurotransmissão nitrérgica no hipocampo dorsal em animais isolados parece tanto inibir ou facilitar as respostas cardiovasculares ao estresse.

Estudos anteriores identificaram efeito do isolamento social em testes comportamentais que avaliaram comportamentos relacionados à ansiedade, aprendizagem espacial e atividade locomotora (Hellemans et al., 2004). O isolamento social teve efeito ansiogênico em diferentes animais com diferentes protocolos de isolamento social (Muchimapura et al., 2003; Hellemans et al., 2004; Ago et al., 2007; Grippo et al., 2007; Lukkes et al., 2008). Desse modo, os nossos dados indica um efeito ansiogênico do isolamento social corroboram com dados prévios da literatura.

O isolamento altera a atividade pré-sináptica do receptor 5-HT<sub>1B</sub>, mas não pós-sináptico 5-HT<sub>1A</sub> no hipocampo (Muchimapura et al., 2003). Além disso, outras disfunções no hipocampo incluem redução da neurotransmissão serotoninérgica e aumento na atividade muscarínica (Muchimapura et al., 2002; Muchimapura et al., 2003). Estes efeitos têm sido descritos como parte dos mecanismos neurobiológicos das alterações comportamentais do isolamento (Muchimapura et al., 2002; Muchimapura et al., 2003). Nesse sentido, os achados do presente estudo não fornecem evidências de um envolvimento da neurotransmissão nitrérgica, agindo através da nNOS, no hipocampo dorsal no controle do comportamento relacionado à ansiedade em animais isolados. De fato, nós não identificamos a inibição da nNOS ou do sequestro do NO no hipocampo dorsal nessa resposta em animais expostos ao estresse social crônico. Além disso, os nossos dados são controversos com estudos prévios que identificaram um envolvimento da via do receptor NMDA, nNOS e cGMP no hipocampo dorsal na expressão do medo condicionado ao contexto (Fabri et al., 2014). Além disso, foi demonstrado um efeito ansiogênico do NO no giro dentado do hipocampo dorsal, e a administração local de ODQ, um inibidor de guanilato ciclase solúvel (GCs), produziu efeitos ansiolíticos nos testes labirinto em cruz elevado e Vogel semelhantes àqueles observados com os inibidores da NOS (Spolidório et al., 2007). Desse modo, nossos dados não corroboram com as evidências de uma ação ansiogênica do NO oriundo da nNOS no hipocampo dorsal. Além disso, os resultados reportados aqui constituem a primeira evidência do

envolvimento mecanismo neuroquímico da nNOS e NOS no hipocampo dorsal não estarem atuando na resposta ansiogênica ao estresse social crônico.

Zlatkovic´ et al., (2014) mostraram que o estresse de isolamento social durante 21 dias em ratos Wistar alterou os comportamentos dos animais no teste de nado forçado, aumentando o tempo de imobilidade e diminuindo comportamentos de natação e escalada (Zlatkovic´ et al., 2014). Além disso, foi reportado que o isolamento social diminuiu a preferência à sacarose (Zlatkovic´ et al., 2014), o que sugere um efeito anedônico desse estressor social. Esses dados corroboram com o nosso em que o isolamento promoveu alterações comportamentais do tipo depressivas. Nós identificamos que quando os animais isolados foram tratados com NPLA ou carboxy-PTIO no hipocampo dorsal tiveram um menor tempo de imobilidade em comparação aos animais veículos, o que indica um envolvimento da neurotransmissão nitrérgica no hipocampo dorsal atuando via a nNOS nos efeitos comportamentais do tipo depressivo induzidos pelo isolamento social. Nossos resultados corroboram com dados prévios do nosso grupo que evidenciaram que o tratamento crônico com 7-NI inibiu os efeitos do estresse crônico variado em aumentar a imobilidade no teste de nado forçado (Almeida et al., 2015). Além disso, nossos resultados reforçam evidências prévias que indicaram a neurotransmissão nitrérgica no hipocampo dorsal como um importante mecanismo neurobiológico da depressão (Joca e Guimarães, 2006). Entretanto, os resultados reportados aqui constituem a primeira evidência do envolvimento desse mecanismo neuroquímico no hipocampo dorsal nas respostas comportamentais do tipo depressivas a estressores sociais.

Nós não identificamos alterações estatisticamente significativas na expressão da nNOS no hipocampo dorsal após cinco semanas de isolamento social, apesar de os dados claramente indicarem uma tendência de aumento (aumento de 53% em relação ao grupo controle). Um aumento na formação local de NO no hipocampo dorsal foi evidenciado no presente estudo pelo aumento nos níveis de nitrotirosina no hipocampo dorsal nos animais isolados. O peroxinitrito, uma espécie reativa de nitrogênio, causa a nitração de resíduos de tirosina gerando nitrotirosina (Beal, 2002). O peroxinitrito pode ser formado a partir da reação do ânion superóxido com o NO (Herce-Pagliai et al., 1998). Desse modo, a dosagem de nitrotirosina é frequentemente empregada como um indicador dos níveis locais de NO (Kaur e Halliwell, 1994; Herce-Pagliai et al., 1998; Hanafy et al., 2001; Ratajczak-Wrona et al., 2013). Desse modo, os

nossos dados indicam um aumento nos níveis locais de NO no hipocampo dorsal dos animais isolados. Esses achados estão de acordo com evidências de que situações aversivas agudas aumentam a concentração de nitrito (metabólito NO) no hipocampo dorsal (Fabri et al., 2014; Moraes-Neto et al., 2014). Nossos dados também reproduzem dados anteriores que identificaram aumento nos níveis de nitrito no hipocampo de animais isolados (Amiri et al., 2014; Zlatkovic´ et al., 2014). Assim, um envolvimento da neurotransmissão nitrérgica no hipocampo dorsal nas respostas comportamentais e cardiovasculares ao estresse de isolamento social está relacionado com um aumento nos níveis locais de NO, possivelmente mediada por um aumento na expressão da nNOS local.

## 7. CONCLUSÃO

Em suma, os resultados documentados no presente estudo fornecem evidências de que a neurotransmissão nitrérgica no hipocampo dorsal modula as respostas cardíacas do barorreflexo. No entanto, o controle das respostas durante o aumento e a diminuição da pressão arterial é mediado por isoformas específicas da NOS. De fato, nossos resultados indicam que a ativação da nNOS e da iNOS exerce uma influência inibitória na bradicardia reflexa, a iNOS medeia a taquicardia reflexa, enquanto a eNOS desempenha um papel facilitatório na bradicardia reflexa.

O isolamento social aumentou a liberação de NO no hipocampo dorsal. Nossos resultados indicam que esse aumento nos níveis de NO no hipocampo dorsal mediado pela ativação da nNOS esteja envolvido nas alterações comportamentais do tipo depressivo, mas não do tipo ansioso desencadeadas pelo isolamento social. O NO derivado da nNOS no hipocampo dorsal de animais isolados também desempenha um papel inibitório nas respostas de aumento da pressão arterial e FC, além de facilitar a vasoconstrição cutânea mediada pelo simpático durante o estresse de restrição em animais sujeitos ao isolamento social.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI M, ABE M, SASAKI T, KATO H, KASAHARA J, ARAKI T. Role of inducible or neuronal nitric oxide synthase in neurogenesis of the dentate gyrus in aged mice. *Metab Brain Dis.* 25:419–424, 2010.

AGO Y, TAKAHASHI K, NAKAMURA S, HASHIMOTO H, BABA A, MATSUDA T. Anxiety-like and exploratory behaviors of isolation-reared mice in the staircase test. *J Pharmacol Sci* 104:153–8, 2007.

AKERT K, ANDY OJ. Experimental studies on the Ammon's formation in cats and monkeys. *Trans Am Neurol Assoc.* 3:194–5, 195–7, 1953.

ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357:593–615, 2001.

ALVES FH, CRESTANI CC, RESSTEL LB, CORREA FM. Bed nucleus of the stria terminalis N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide modulate the baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. *J Neurosci Res.* 87(7):1703-11, 2009.

ALMEIDA J, DUARTE JO, OLIVEIRA LA, CRESTANI CC. Effect of nitric oxide synthesis inhibitor or fluoxetine treatment in depression-like state and cardiovascular changes induced by chronic variable stress in rats. *Stress.* 18: 462-474, 2015.

AMIRI S, SHIRZADIAN A, HAJ-MIRZAIAN A, IMRAN-KHAN M, BALAEI MR, KORDJAZY N, DEHPOUR AR, MEHR SE. Involvement of the nitregeric system in the proconvulsant effect of social isolation stress in male mice. *Epilepsy Behav.* 41:158-63, 2014.

AMITAI Y. Physiologic role for “inducible” nitric oxide synthase: a new form of astrocytic-neuronal interface. *Glia.* 58:1775–1781, 2010.

ANAND BK, DUA S. Circulatory and respiratory changes induced by electrical stimulation of limbic system (visceral brain). *J Neurophysiol.* 19:393–400, 1956a.

ANAND BK, DUA S. Electrical stimulation of the limbic system of brain (visceral brain) in the waking animals. *Indian J Med Res.* 44:107–119, 1956b.

BANNERMAN DM, DEACON RM, OFFEN S, FRISWELL J, GRUBB M, RAWLINS JN. Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behav Neurosci.* 116(5):884-901, 2002.

BARRETTO-DE-SOUZA L, ADAMI MB, OLIVEIRA LA, GOMES-DE-SOUZA L, DUARTE JO, ALMEIDA J, CRESTANI CC. Nitric oxide-cGMP-PKG signaling in the bed nucleus of the stria terminalis modulates the cardiovascular responses to stress in male rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 28:75–84, 2018.

BEAL MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med.* 32:797-803, 2002.

BERTOGLIO LJ, JOCA SR, GUIMARÃES FS. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behav Brain Res.* 175(1):183-8, 2006.

BLACKSHAW S, ELIASSON MJ, SAWA A, WATKINS CC, KRUG D, GUPTA A, ARAI T, FERRANTE RJ, SNYDER SH. Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity. *Neuroscience.* 119:979–990, 2003.

BREDT DS, GLATT CE, HWANG PM, FOTUHI M, DAWSON TM, SNYDER SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron.* 7:615–624, 1991.

BRENES J.C., RODRÍGUEZ O, FORNAZUERA J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum *Pharmacol. Biochem. Behav.* 89: 85–93, 2008.

BUCHANAN CM, ECCLES JS, BECKER JB. Are adolescents the victims of raging hormones: Evidence for activational effects of hormones on moods and behavior at adolescence. *Psychol Bull.* 111:62–107, 1992.

BUN-HEE LEE, SUNG-WOO LEE, DOKYUNG YOON, HEON-JEONG LEE, JONG-CHUL YANG, SE-HOON SHIM, DO-HOON KIM, RYU SEUNG-HO, CHANGSU HAN, YONG-KU KIM. Increased plasma nitric oxide metabolites in suicide attempters. *Neuropsychobiology*. 53: 127–132, 2006.

BUSKILA Y, FARKASH S, HERSHFINKEL M, AMITAI Y. Rapid and reactive nitric oxide production by astrocytes in mouse neocortical slices. *Glia*. 52:169–176, 2005.

BUSKILA Y, AMITAI Y. Astrocytic iNOS-dependent enhancement of synaptic release in mouse neocortex. *J Neurophysiol*. 103:1322–1328, 2010.

BUWALDA B, GEERDINK M, VIDAL J, KOOLHAAS JM. Social behavior and social stress in adolescence: A focus on animal models. *Neurosci Biobehav Rev*. 35:1713–1721, 2011.

CANTERAS NS, RESSTEL LB, BERTOGLIO LJ, CAROBREZ AP, GUIMARÃES FS. Neuroanatomy of anxiety. *Curr Top Behav Neurosci*. 2:77-96, 2010.

CARLIER PG, CRINE AF, YERNA NM, RORIVE GL. Cardiovascular structural changes induced by isolation-stress hypertension in the rat. *J Hypertens Suppl*. v. 6, n.4, p.112-5. 1988.

CARNEVALI L, TROMBINI M, GRAIANI G, MADEDDU D, QUAINI F, LANDGRAF R, NEUMANN ID, NALIVAICO E, SGOIFO A. Low vagally-mediated heart rate variability and increased susceptibility to ventricular arrhythmias in rats bred for high anxiety. *Physiol Behav*. 128:16-25, 2014.

CARVALHO TH, LOPES OU, TOLENTINO-SILVA FR. Baroreflex responses in neuronal nitric oxide synthase knockout mice (nNOS). *Auton Neurosci*. 126-127:163-8, 2006.

CASTRÉN EL, VÕIKAR V, RANTAMÄKI T. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol*. 7(1):18-21, 2007.

CHO JY, KIM HS, KIM DH, YAN JJ, SUH HW, SONG DK. Inhibitory effects of long-term administration of ferulic acid on astrocyte activation induced by

intracerebroventricular injection of beta-amyloid peptide (1-42) in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29:901–907, 2005.

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

CRESTANI CC, ALVES FH, RESSTEL LB, CORREA FM. Bed nucleus of the stria terminalis alpha(1)-adrenoceptor modulates baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. *Brain Res*. 1245:108–115, 2008.

CRESTANI CC, DEOLINDO M V, ALVES FH, RESSTEL LB, CORREA FM. Non-N-methyl-d-aspartate glutamate receptors in the lateral hypothalamus modulate cardiac baroreflex responses in conscious rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 36:1079–1085, 2009.

CRESTANI CC, ALVES FH, BUSNARDO C, RESSTEL LB, CORREA FM. N-Methyl-d-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. *Neurosci Res*. 67 (4): 317-26. 2010a.

CRESTANI CC, ALVES FH, CORREA FM, GUIMARÃES FS, JOCA SR. Acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis induces antidepressant-like effect in the rat forced swimming test. *Behav Brain Funct*. 6:30, 2010b.

CRESTANI CC, TAVARES RF, GUIMARÃES FS, CORREA FM, JOCA SR, RESSTEL LB. Chronic fluoxetine treatment alters cardiovascular functions in unanesthetized rats. *Eur J Pharmacol*. 670(2-3):527-33, 2011.

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

CRESTANI CC. Adolescent vulnerability to cardiovascular consequences of chronic emotional stress: Review and perspectives for future research. *Neurosci Biobehav Rev*. 74(Pt B):466-475, 2017.

CRUZ FC, ENGI SA, LEÃO RM, PLANETA CS, CRESTANI CC. Influence of the single or combined administration of cocaine and testosterone in autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress. *J Psychopharmacol.* 26(10):1366-74, 2012.

CRUZ FC, DUARTE JO, LEÃO RM, HUMMEL LF, PLANETA CS, CRESTANI CC. Adolescent vulnerability to cardiovascular consequences of chronic social stress: immediate and long-term effects of social isolation during adolescence. *Develop Neurobiol.* 76: 34-46, 2016.

DAMPNEY, R.A., HORIUCHI, J. & MCDOWALL, L.M. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. *Auton. Neurosci.-Basic.* 142: 3–10, 2008.

DAMPNEY RA. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. *Adv Physiol Educ* 40:283–296, 2016.

De WARDENER HE. The hypothalamus and hypertension. *Physiol Rev.* 81(4):1599-658, 2001.

DICARLO, S.E, BISHOP, V.S. Central baroreflex resetting as a means of increasing and decreasing sympathetic outflow and arterial pressure. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 940, 324–337, 2001.

DOREMUS-FITZWATER TL, VARLINSKAYA EI, SPEAR LP. 2009. Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. *Physiol Behav.* 97:484–494, 2009.

DOYLE CA, SLATER P. Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus. *Neuroscience.* 76:387–395, 1997.

DUARTE JO, CRUZ FC, LEAO RM, PLANETA CS, CRESTANI CC. Stress vulnerability during adolescence: comparison of chronic stressors in adolescent and adult rats. *Psychosom Med.* 77: 186–199, 2015.

ECHEVERRY MB, GUIMARÃES FS, DEL BEL EA. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions 125(4): 981–99, 2004.

EISCH AJ, PETRIK D. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science*. 338(6103):72-5, 2012.

ENGIN E, TREIT D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behav Pharmacol*. 18(5-6):365-74, 2007.

FABRI DR, HOTT SC, REIS DG, BIOJONE C, CORRÊA FM, RESSTEL LB. The expression of contextual fear conditioning involves activation of a NMDA receptor-nitric oxide-cGMP pathway in the dorsal hippocampus of rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 24(10):1676-86, 2014.

FAN SJ, JIANG H, YANG LJ, LIU X, SONG J, PAN F. Effects of adrenergic agents on stress-induced brain microstructural and immunochemical changes in adult male Wistar rats. *Ann Anat*. 193(5):418-24, 2011.

FANSELOW MS, DONG HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*. 65(1):7-19, 2010.

FARAVELLI C, LO SAURO C, LELLI L, PIETRINI F, LAZZERETTI L, GODINI L, BENNI L, FIORAVANTI G, TALAMBA GA, CASTELLINI G, RICCA V. The role of life events and HPA axis in anxiety disorders: a review. *Curr Pharm Des*. 18(35):5663-74, 2012.

FERREIRA FR, OLIVEIRA AM, DINARTE AR, PINHEIRO DG, GREENE LJ, SILVA WA JR, JOCA SR, GUIMARÃES FS. Changes in hippocampal gene expression by 7-nitroindazole in rats submitted to forced swimming stress. *Genes Brain Behav*. 11(3):303-13, 2012.

FERREIRA-JUNIOR NC, LAGATTA DC, FABRI DR, ALVES FH, CORREA FM, RESSTEL LB. Hippocampal subareas arranged in the dorsal-ventral axis modulate cardiac baroreflex function in a site-dependent manner in rats. *Exp Physiol*. 102.1: 4–24, 2017.

FERREIRA-JUNIOR, N.C., LAGATTA, D.C. & RESSTEL, L.B.M. Glutamatergic, GABAergic, and endocannabinoid neurotransmissions within the dorsal hippocampus modulate the cardiac baroreflex function in rats. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 470: 395-411, 2018.

FERBINTEANU J, RAY C, MCDONALD RJ. Both dorsal and ventral hippocampus contribute to spatial learning in Long-Evans rats. *Neurosci Lett.* 345(2):131-5, 2003.

FISCHER CW, LIEBENBERG N, ELFVING B, LUND S, WEGENER G. Isolation-induced behavioural changes in a genetic animal model of depression. *Behav Brain Res.* 230(1):85-91, 2012.

FLAK JN, JANKORD R, SOLOMON MB, KRAUSE EG, HERMAN JP. Opposing effects of chronic stress and weight restriction on cardiovascular, neuroendocrine and metabolic function. *Physiol Behav.* 104(2):228-34, 2011.

FONE KC, PORKESS MV. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 32(6):1087-102, 2008.

FORESTIERO D, MANFRIM CM, GUIMARÃES FS, DE OLIVEIRA RM. Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. *Psychopharmacology (Berl).* 184(2):166-72, 2006.

FORSTERMANN U, GATH I, SCHWARZ P, CLOSS EI, KLEINERT H. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol.* 50:1321-1332, 1995.

GAMALLO A, VILLANUA A, TRANCHO G, FRAILE A. Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiol Behav.* v.36, n.2, p.217-21. 1986.

GARDINER SM, BENNETT T. The cardiovascular and renal responses to short-term isolation in Brattleboro rats. *Clin Sci (Lond).* v.64, n.4, p377-82. 1983.

GARTHWAITE J, CHARLES SL, CHESS-WILLIAMS R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature.* 336(6197):385-8, 1988.

GARTHWAITE J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci.* 27(11):2783-802, 2008.

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

GRASSI, G, TREVANO, FQ, SERAVALLE, G, SCOPELLITI, F, MANCIA, G. Baroreflex function in hypertension: consequences for antihypertensive therapy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 48: 407–415, 2006.

GRIPPO AJ, MOFFITT JA, JOHNSON AK. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 282(5):R1333-41, 2002.

GRIPPO AJ, BELTZ TG, WEISS RM, JOHNSON AK. The effects of chronic fluoxetine treatment on chronic mild stress-induced cardiovascular changes and anhedonia. *Biol Psychiatry.* 59(4): 309-316, 2006.

GRIPPO AJ, LAMB DG, CARTER CS, PORGES SW. Social isolation disrupts autonomic regulation of the heart and influences negative affective behaviors. *Biol Psychiatry* v.62, n.10, p.1162-70. 2007.

GRIPPO AJ, WU KD, HASSAN I, CARTER CS. Social isolation in prairie voles induces behaviors relevant to negative affect: toward the development of a rodent model focused on co-occurring depression and anxiety. *Depress Anxiety.* 25(6):E17-26, 2008.

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

GRIPPO AJ. The Utility of Animal Models in Understanding Links between Psychosocial Processes and Cardiovascular Health. *Soc Personal Psychol Compass.* 5(4):164-179, 2011.

GUIMARÃES FS, BEIJAMINI V, MOREIRA FA, AGUIAR DC, DE LUCCA AC. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci Biobehav Rev.* 29(8):1313-22, 2005.

GUIX FX, URIBESALGO I, COMA M, MUNOZ FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol.* 76:126–152, 2005.

HANAFY KA, KRUMENACKER JS, MURAD F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit.* 7(4):801-19, 2001.

HARE DL, TOUKHSATI SR, JOHANSSON P, JAARSMA T. Depression and cardiovascular disease: a clinical review. *Eur Heart J.* 35(21):1365-72, 2014.

HECKER M, MITCHELL JA, HARRIS HJ, KATSURA M, THIEMERMANN C, VANE JR. Endothelial cells metabolize NG-monomethyl-L-arginine to L-citrulline and subsequently to L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun.* 167(3):1037-43, 1990.

HEIBERG IL, WEGENER G, ROSENBERG R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. *Behav Brain Res.* 134(1-2):479-84, 2002.

HELLEMANS KG, BENGE LC, OLMSTEAD MC. Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Brain Res Dev Brain Res.* 150: 103–115, 2004.

HERCE-PAGLIAI C, KOTECHEA S, SHUKER DE. Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review. *Nitric Oxide.* 2(5):324-36, 1998.

HIROAKI-SATO VA, SALES AJ, BIOJONE C, JOCA SR. Hippocampal nNOS inhibition induces an antidepressant-like effect: involvement of 5HT1A receptors. *Behav Pharmacol.* 25(3):187-196, 2014.

HONZIKOVA N, FISER B. Baroreflex sensitivity and essential hypertension in adolescents. *Physiol. Res.* 58: 605–612, 2009.

HOPPER RA, GARTHWAITE J. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci.* 26:11513–11521, 2006.

HU Y, WU DL, LUO CX, ZHU LJ, ZHANG J, WU HY, ZHU DY. Hippocampal nitric oxide contributes to sex difference in affective behaviors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109(35):14224-9, 2012.

HUFFMAN JC, CELANO CM, JANUZZI JL. The relationship between depression, anxiety, and cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 6:123-36, 2010.

IKEDA H, MURASE K. Glial nitric oxide-mediated long-term presynaptic facilitation revealed by optical imaging in rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* 24:9888–9896, 2004.

INUI K, NOMURA J, MURASE S, NOSAKA S. Facilitation of the arterial baroreflex by the preoptic area in anaesthetized rats. *J Physiol.* 488 (Pt 2):521–531, 1995.

ISINGRINI E, SURGET A, BELZUNG C, FRESLON JL, FRISBEE J, O'DONNELL J, CAMUS V, D'AUDIFFRET A. Altered aortic vascular reactivity in the unpredictable chronic mild stress model of depression in mice: UCMS causes relaxation impairment to ACh. *Physiol Behav.* 103(5):540-6, 2011.

JAFFREY SR, SNOWMAN AM, ELIASSON MJ, COHEN NA, SNYDER SH. CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron.* 20(1):115-24, 1998.

JAHNG JW, YOO SB, RYU V, LEE JH. Hyperphagia and depression-like behavior by adolescence social isolation in female rats. *Int J Dev Neurosci.* 30(1):47-53, 2012.

JANKORD R, SOLOMON MB, ALBERTZ J, FLAK JN, ZHANG R, HERMAN JP. Stress vulnerability during adolescent development in rats. *Endocrinology.* 152:629–638, 2011.

JEFFERYS D, FUNDER J. Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. *Eur J Pharmacol.* 295(2-3):131-5, 1996.

JOCA, S.R; GUIMARÃES, F.S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berl).* 185: 298–305, 2006.

JOCA SR, FERREIRA FR, GUIMARÃES FS. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. *Stress*. 10(3):227-49, 2007.

KAUR H, HALLIWELL B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett*. 350(1):9-12, 1994.

KHEIRBEK MA, DREW LJ, BURGHARDT NS, COSTANTINI DO, TANNENHOLZ L, AHMARI SE, ZENG H, FENTON AA, HEN R. Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron*. 77(5):955-68, 2013.

KISHI T, HIROOKA Y, KIMURA Y, SAKAI K, ITO K, SHIMOKAWA H, TAKESHITA A. Overexpression of eNOS in RVLM improves impaired baroreflex control of heart rate in SHRSP. Rostral ventrolateral medulla. Stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 41:255–260, 2003.

KJELSTRUP KG, TUVNES FA, STEFFENACH HA, MURISON R, MOSER EI, MOSER MB. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(16):10825-30, 2002.

KNOX S. S. AND UVNAS-MOBERG, K. Social isolation and cardiovascular disease: an atherosclerotic pathway? *Psychoneuroendocrinology*. 23: 877–890, 1998.

KUBZANSKY LD1, KAWACHI I. Going to the heart of the matter: do negative emotions cause coronary heart disease? *J Psychosom Res*. 48(4-5):323-37, 2000.

KUNTZE LB, FERREIRA-JUNIOR NC, LAGATTA DC, RESSTEL LB. Ventral hippocampus modulates bradycardic response to peripheral chemoreflex activation in awake rats. *Exp Physiol*. 101:482–493, 2006.

LEI J, VODOVOTZ Y, TZENG E, BILLIAR TR. Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. *Nitric Oxide*. 35: 175-185, 2013.

LIN LH, TAKTAKISHVILI O, TALMAN WT. Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarii. *Brain Res.* 1171:42–51, 2007.

LIN LH, NITSCHKE DRAGON D, JIN J, TIAN X, CHU Y, SIGMUND C, TALMAN WT. Decreased expression of neuronal nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarii inhibits sympathetically mediated baroreflex responses in rat. *J Physiol.* 590:3545–3559, 2012.

LOUREIRO M, LECOURTIER L, ENGELN M, LOPEZ J, COSQUER B, GEIGER K, KELCHE C, CASSEL JC, PEREIRA DE VASCONCELOS A. The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory. *Brain Struct Funct.* 217(1):93-106, 2012.

LUKKES JL, MOKIN MV, SCHOLL JL, FORSTER GL. Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. *Hormones and behavior.* 55:248–256, 2009.

MARIN MT, CRUZ FC, PLANETA CS. Cocaine-induced behavioral sensitization in adolescent rats endures until adulthood: lack of association with GluR1 and NR1 glutamate receptor subunits and tyrosine hydroxylase. *Pharmacol Biochem Behav.* 91(1):109-14, 2008.

MARTIN S, LINO-DE-OLIVEIRA C, JOCA SR, WEFFORT DE OLIVEIRA R, ECHEVERRY MB, DA SILVA CA, PARDO L, STUHMER W, BEL ED. Eag 1, Eag 2 and Kcnn3 gene brain expression of isolated reared rats. *Genes Brain Behav* 9:918-924, 2010.

MASLOVA LN, BULYGINA VV, AMSTISLAVSKAYA TG. Prolonged social isolation and social instability in adolescence in rats: immediate and long-term physiological and behavioral effects. *Neurosci Behav Physiol.* 40: 955-963, 2010.

MARTINOWICH K, MANJI H, LU B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci.* 10(9):1089-93, 2007.

MAYOROV DN. Selective sensitization by nitric oxide of sympathetic baroreflex in rostral ventrolateral medulla of conscious rabbits. *Hypertension*. 45:901–906, 2005.

McCORMICK, C.M., MATHEWS, I.Z., THOMAS, C., WATERS, P., Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain Cogn*. 72: 73–85, 2010.

McEWEN BS. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*. 840:33-44, 1998.

McEWEN BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*. 87(3):873-904, 2007.

MEHTA B, BEGUM G, JOSHI NB, JOSHI PG. Nitric oxide-mediated modulation of synaptic activity by astrocytic P2Y receptors. *J Gen Physiol*. 132:339–349, 2008.

MELTZER H, BEBBINGTON P, DENNIS MS, JENKINS R, MCMANUS S, BRUGHA TS. Feelings of loneliness among adults with mental disorder. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*. 48(1):5-13, 2013.

MENARD J, TREIT D. The anxiolytic effects of intra-hippocampal midazolam are antagonized by intra-septal 1-glutamate. *Brain Res*. 888:163–6, 2001.

MICHELINI LC, O'LEARY DS, RAVEN PB, NOBREGA AC. Neural control of circulation and exercise: a translational approach disclosing interactions between central command, arterial baroreflex, and muscle metaboreflex. *Am. J. Physiol. Heart C*. 309: H381–H392, 2015.

MOHAMED BM, ABOUL-FOTOUH S, IBRAHIM EA, SHEHATA H, MANSOUR AA, YASSIN NA, EL-ERAKY W, ABDEL-TAWAB AM. Effects of pentoxifylline, 7-nitroindazole, and imipramine on tumor necrosis factor- $\alpha$  and indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme activity in the hippocampus and frontal cortex of chronic mild-stress-exposed rats. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 9:697-708, 2013.

MONTEZUMA K, BIOJONE C, LISBOA SF, CUNHA FQ, GUIMARAES FS, JOCA SR. Inhibition of iNOS induces antidepressant-like effects in mice: pharmacological and genetic evidence. *Neuropharmacology*. 62:485–491, 2012.

MORAES-NETO TB, SCOPINHO AA, BIOJONE C, CORRÊA FMA, RESSEL LB. Involvement of dorsal hippocampus glutamatergic and nitrenergic neurotransmission in autonomic responses evoked by acute restraint stress in rats. *Neuroscience*. v.258. p. 364–373, 2014.

MOSER MB1, MOSER EI. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*. 8(6):608-19, 1998.

MUCHIMAPURA S, FULFORD AJ, MASON R, MARSDEN CA. Isolation rearing in the rat disrupts the hippocampal response to stress. *Neuroscience*. 112(3):697–705, 2002.

MUCHIMAPURA S, MASON R, MARSDEN CA. Effect of isolation rearing on preand post-synaptic serotonergic function in the rat dorsal hippocampus. *Synapse*. 47: 209–217, 2003.

MURAKAMI H, LIU JL, YONEYAMA H, NISHIDA Y, OKADA K, KOSAKA H, MORITA H, ZUCKER IH. Blockade of neuronal nitric oxide synthase alters the baroreflex control of heart rate in the rabbit. *Am J Physiol*. 274(1 Pt 2):R181-6, 1998.

MURRAY CJ, VOS T, LOZANO R, NAGHAVI M, FLAXMAN AD, MICHAUD C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 380(9859): 2197-2223, 2012.

MYERS B. Corticolimbic regulation of cardiovascular responses to stress. *Physiol Behav*. 172:49–59, 2017.

NAKHATE, KT, KOKARE, DM, SINGRU, PS E SUBHEDAR, NK. Central regulation of feeding behavior during social isolation of rat: evidence for the role of endogenous CART system. *Int. J. Obes*. 35, 773-784, 2011.

NAYLOR GJ, SMITH AH, CONNELLY P. A controlled trial of methylene blue in severe depressive illness. *Biol Psychiatry*. 22(5):657-9, 1987.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. *Neuron*, v. 34, p. 13-25, 2002.

NORMAN GJ, ZHANG N, MORRIS JS, KARELINA K, BERNTSON GG, DEVRIES AC. Social interaction modulates autonomic, inflammatory, and depressive-like responses to cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(37):16342-7, 2010.

OLIVEIRA, R.M; GUIMARÃES, F.S; DEAKIN, J.F. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41: 333–341, 2008.

OLIVEIRA, L.A., ALMEIDA, J., BENINI, R., CRESTANI, C.C. CRF1 and CRF2 receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Pharmacol. Res.* 95–96, 53–62, 2015.

OLIVEIRA LA, GOMES-DE-SOUZA L, BENINI R, CRESTANI, CC. Control of cardiovascular responses to stress by CRF in the bed nucleus of stria terminalis is mediated by local NMDA/nNOS/sGC/PKG signaling. *Psychoneuroendocrinology*. 89: 168 – 176, 2018.

PADOVAN CM, DEL BEL EA, GUIMARÃES FS. Behavioral effects in the elevated plus-maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 67: 325–330, 2000.

PADOVAN CM, GUIMARÃES FS. Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 77(1):15-9, 2004.

PATEL KP, ZHENG H. Central neural control of sympathetic nerve activity in heart failure following exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 302(3):H527-37, 2012.

PATON JF, WAKI H, ABDALA AP, DICKINSON J, KASPAROV S. Vascular-brain signaling in hypertension: role of angiotensin II and nitric oxide. *Curr Hypertens Rep.* 9:242–247, 2007.

PAXINOS G, WATSON C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 3 ed. Sidney, Australia: Academic Press, 1997.

PAWLIK G, RACKL A, BING RJ. Quantitative capillary topography and blood flow in the cerebral cortex of cats: an in vivo microscopic study. *Brain Res.* 208:35–58, 1981.

PEULER JD, SCOTTI MA, PHELPS LE, MCNEAL N, GRIPPO AJ. Chronic social isolation in the prairie vole induces endothelial dysfunction: implications for depression and cardiovascular disease. *Physiol Behav.* 106:476-484, 2012.

PINNOCK SB, BALENDRA R, CHAN M, HUNT LT, TURNER-STOKES T, HERBERT J. Interactions between nitric oxide and corticosterone in the regulation of progenitor cell proliferation in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuropsychopharmacology.* 32:493–504, 2007.

PYNER S. The paraventricular nucleus and heart failure. *Exp Physiol.* 99(2):332-9, 2014.

PELLOW S, FILE SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* v. 24, n. 3, p. 525-9, 1986.

PITTENGER C, DUMAN RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology.* 33(1):88-109, 2008.

PORSOLT RD, LE PICHON M, JALFRE M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 266(5604): 730-732, 1977.

PRAST, H., PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* 64, 51-68, 2001.

RATAJCZAK-WRONA W, JABLONSKA E, ANTONOWICZ B, DZIEMIANCZYK D, GRABOWSKA SZ. Levels of biological markers of nitric oxide

in serum of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oral Sci.* 5(3):141-5, 2013.

RESSTEL LBM, CORRÊA FMA. Medial prefrontal cortex NMDA receptors and nitric oxide modulate the parasympathetic component of the baroreflex. *Eur J Neurosci.* 23:481–488, 2006.

RESSTEL LB, JOCA SR, CORRÊA FM, GUIMARÃES FS. Effects of reversible inactivation of the dorsal hippocampus on the behavioral and cardiovascular responses to an aversive conditioned context. *Behav Pharmacol.* 19(2):137-44, 2008a.

RESSTEL LB, CORRÊA FM, GUIMARÃES FS. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex.* 18(9): 2027-35, 2008b.

RINWA P, KUMAR A. Modulation of nitrenergic signalling pathway by American ginseng attenuates chronic unpredictable stress-induced cognitive impairment, neuroinflammation, and biochemical alterations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 387(2):129-41, 2014.

ROGGE, G., JONES, D., HUBERT, GW, LIN, Y. E KUHAR, MJ. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat. Rev. Neurosci.* 9: 747-758, 2008.

ROZANSKI A, BLUMENTHAL JA, KAPLAN J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation.* 99(16):2192-217, 1999.

RUIT KG, NEAFSEY EJ. Cardiovascular and respiratory responses to electrical and chemical stimulation of the hippocampus in anesthetized and awake rats. *Brain Res.* 457:310–321, 1988.

SANTINI CO, FASSINI A, SCOPINHO AA, BUSNARDO C, CORREA FM, RESSTEL LB. The ventral hippocampus NMDA receptor/nitric oxide/guanylate cyclase pathway modulates cardiovascular responses in rats. *Auton Neurosci.* 177(2):244-52, 2013.

SCOPINHO AA, LISBOA SF, GUIMARÃES FS, CORRÊA FM, RESSTEL LB, JOCA SR. Dorsal and ventral hippocampus modulate autonomic responses but not behavioral consequences associated to acute restraint stress in rats. *PLoS One*. 8(10):e77750, 2013.

SEIDEL B, STANARIUS A, WOLF G. Differential expression of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in blood vessels of the rat brain. *Neurosci Lett*. 239:109–112, 1997.

SESTAKOVA N, PUZSEROVA A, KLUKNAVSKY M, BERNATOVA I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdiscip Toxicol*. 6(3):126-35, 2013.

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

SPEAR LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev*. 24:417–463, 2000.

SPOLIDÓRIO PC, ECHEVERRY MB, IYOMASA M, GUIMARÃES FS, DEL BEL EA. Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. *Psychopharmacology (Berl)*.195(2):183-92, 2007.

STANARIUS A, TOPEL I, SCHULZ S, NOACK H, WOLF G. Immunocytochemistry of endothelial nitric oxide synthase in the rat brain: a light and electron microscopical study using the tyramide signal amplification technique. *Acta Histochem*. 99:411–429, 1997.

STEPTOE A, KIVIMÄKI M. Stress and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 9(6):360-70, 2012.

STERLING P. Allostasis: a model of predictive regulation. *Physiol Behav*. 106(1):5-15, 2012.

STERN JE. Nitric oxide and homeostatic control: an intercellular signalling molecule contributing to autonomic and neuroendocrine integration? *Prog Biophys Mol Biol*. 84(2-3):197-215, 2004.

STONE EA, QUARTERMAIN D. Greater behavioral effects of stress in immature as compared to mature male mice. *Physiol Behav.* 63:143–145, 1997.

SUBHEDAR, NK, NAKHATE, KT, UPADHYA, MA E KOKARE, DM. CART in the brain of vertebrates: circuits, functions and evolution. *Peptides.* 54: 108-130, 2014.

SUZUKI, E; G. YAGI, G; NAKAKI, T; KANBA, S; ASAI, M. Elevated plasma nitrate levels in depressive states, *J. Affect Disord.* 63: 221–224, 2001.

TALMAN WT, DRAGON DN. Transmission of arterial baroreflex signals depends on neuronal nitric oxide synthase. *Hypertension.* 43:820–824, 2004.

TANG L, WANG H, ZIOLO MT. Targeting NOS as a therapeutic approach for heart failure. *Pharmacol Ther.* 142(3): 306-315, 2014.

THURSTON RC, REWAK M, KUBZANSKY LD. An anxious heart: anxiety and the onset of cardiovascular diseases. *Prog Cardiovasc Dis.* 55(6):524-37, 2013.

TIRELLI E, LAVIOLA G, ADRIANI W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci. Biobehav Rev.* 27, 163–178, 2003.

TISHKINA A, RUKHLENKO A, STEPANICHEV M, LEVSHINA I, PASIKOVA N, ONUFRIEV M, MOISEEVA Y, PISKUNOV A, GULYAEVA N. Region-specific changes in activities of cell death-related proteases and nitric oxide metabolism in rat brain in a chronic unpredictable stress model. *Metab Brain Dis.* 27(4):431-41, 2012.

TSOUKIAS NM, POPEL AS. A model of nitric oxide capillary exchange. *Microcirculation.* 10:479–495, 2003.

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

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

VINCENT SR, KIMURA H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*. 46:755–784, 1992.

VOS T, FLAXMAN AD, NAGHAVI M, LOZANO R, MICHAUD C, EZZATI M, et al., Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 380(9859): 2163-2196, 2012.

WAKI H, KASPAROV S, WONG LF, MURPHY D, SHIMIZU T, PATON JF. Chronic inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity in nucleus tractus solitarius enhances baroreceptor reflex in conscious rats. *J Physiol*. 546:233–242, 2003.

WEISS IC, PRYCE CR, JONGEN-RELO AL, NANZ-BAHR NI, FELDON J. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behav Brain Res*. 152:279–295, 2004.

WILLNER P. Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*. 52:90–110, 2005.

WILLNER P, SCHEEL-KRÜGER J, BELZUNG C. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci Biobehav Rev*. 37(10 Pt 1):2331-71, 2013.

WULSIN LR, SINGAL BM. Do depressive symptoms increase the risk for the onset of coronary disease? A systematic quantitative review. *Psychosom Med*. 65(2):201-10, 2003.

YAZIR Y, UTKAN T, ARICIOGLU F. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase prevents depression-like behaviour in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 111(3):154-60, 2012.

YILDIZ F, ERDEN BF, ULAK G, UTKAN T, GACAR N. Antidepressant-like effect of 7 nitroindazole in the forced swimming test in rats, *Psychopharmacology (Berl)* 149: 41–44, 2000.

YOSHINO Y, OCHI S, YAMAZAKI K, NAKATA S, IGA JI, UENO SI. Endothelial nitric oxide synthase in rat brain is downregulated by sub-chronic antidepressant treatment. *Psychopharmacol.* 234:1663–1669, 2017.

YUYUN MF, NG LL, NG GA. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy? *Microvasc Res.* 119:7–12, 2018.

ZANZINGER J. Role of nitric oxide in the neural control of cardiovascular function. *Cardiovasc Res.* 43(3):639-49, 1999.

ZANZINGER J. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. *Auton Neurosci.* 98(1-2):24-7, 2002.

ZHANG J, HUANG XY, YE ML, LUO CX, WU HY, HU Y, ZHOU QG, WU DL, ZHU LJ, ZHU DY. Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor in modulating anxiety-related behaviors. *J Neurosci.* 30(7):2433-41, 2010.

ZHOU QG, HU Y, HUA Y, HU M, LUO CX, HAN X, ZHU XJ, WANG B, XU JS, ZHU DY. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem.* 103(5):1843-54, 2007.

ZHOU L, ZHU DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide.* 20:223–230, 2009.

ZHOU QG, ZHU LJ, CHEN C, WU HY, LUO CX, CHANG L, ZHU DY. Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulating glucocorticoid receptor. *J Neurosci.* 31(21):7579-90, 2011.

ZHU LJ, LI TY, LUO CX, JIANG N, CHANG L, LIN YH, ZHOU HH, CHEN C, ZHANG Y, LU W, GAO LY, MA Y, ZHOU QG, HU Q, HU XL, ZHANG J, WU HY, ZHU DY. CAPON-nNOS coupling can serve as a target for developing new anxiolytics. *Nat Med.* 20(9):1050-4, 2014.

ZLATKOVIĆ J, TODOROVIĆ N, BOŠKOVIĆ M, PAJOVIĆ SB, DEMAJO M, FILIPOVIĆ D. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. *Mol Cell Biochem.* 393(1-2):43-57, 2014.