



MELISSA TEIXEIRA GOULART

**PARTICIPAÇÃO DAS NEUROTRANSMISSÕES
GLUTAMATÉRGICA E NITRÉRGICA NO CÓRTEX
INSULAR SOB AS RESPOSTAS AUTONÔMICAS E
NEUROENDÓCRINAS DESENCADEADAS PELO
ESTRESSE AGUDO**

**LAVRAS – MG
2019**



MELISSA TEIXEIRA GOULART

**PARTICIPAÇÃO DAS NEUROTRANSMISSÕES
GLUTAMATÉRGICA E NITRÉRGICA NO CÓRTEX
INSULAR SOBRE RESPOSTAS AUTONÔMICAS E
NEUROENDÓCRINAS DESENCADEADAS PELO
ESTRESSE AGUDO**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em Neurobiologia experimental, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr: Fernando Henrique Ferrari Alves
Orientador

**LAVRAS - MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Goulart, Melissa Teixeira.

Participação das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica no Córtex Insular sobre respostas autonômicas e neuroendócrinas desencadeadas pelo estresse agudo. / Melissa Teixeira Goulart. - 2019.

99 p.bbb: il.

Orientador(a): Fernando Henrique Ferrari Alves.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Glutamato e Óxido nítrico. 2. Estresse agudo. 3. Respostas autonômicas e neuroendócrinas. I. Alves, Fernando Henrique Ferrari. II. Título.

MELISSA TEIXEIRA GOULART

**PARTICIPAÇÃO DAS NEUROTRANSMISSÕES GLUTAMATÉRGICA E
NITRÉRGICA NO CÓRTEX INSULAR SOBRE RESPOSTAS AUTONÔMICAS E
NEUROENDÓCRINAS DESENCADEADAS PELO ESTRESSE AGUDO**

**INFLUENCE OF GLUTAMATERGIC AND NITRERGIC
NEUROTRANSMISSIONS ON AUTONOMIC AND NEUROENDOCRINE
RESPONSES TRIGGERED BY ACUTE RESTRICTION STRESS.**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em Neurobiologia experimental, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 19 de dezembro de 2019

Prof. Dra Roseli Soncini - UNIFAL-MG

Prof. Dr. Bruno Del Bianco Borges – UFLA-MG

Prof. Dr: Fernando Henrique Ferrari Alves (Orientador) - UFLA-MG

Prof. Dr: Fernando Henrique Ferrari Alves
Orientador

**LAVRAS - MG
2019**

Dedico ao meu eterno e grande amor, Helder, meu pai. Por ser a minha maior motivação para a pesquisa, mesmo sem saber e entender. Por me mostrar com exemplos o quanto a vida tem a nos ensinar. Por ser minha maior referência de superação, aprendizado e resiliência. Por me mostrar com sua luta, dia após dia, que as dificuldades não são tão importantes quando se tem amor. Seu sorriso e amor serão meus combustíveis, para sempre!

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Primeiramente, agradeço a todos os animais que deram suas vidas para que este estudo fosse realizado.

Ao Professor Fernando Henrique Ferrari Alves, por me receber tão bem e proporcionar toda esta vivência em pesquisa que tanto me enriqueceu. Por todas as oportunidades de crescimento, todo o auxílio em dias de experimento em Lavras e em momentos de desespero com a pesquisa. Por todos os conselhos, ensinamentos e amizade. Muito obrigada por tudo!

Ao laboratório de Farmacologia de Ribeirão Preto-USP, por me receber com tanto carinho e acolhimento. Levo para sempre os aprendizados recebidos ali.

- Em especial ao Professor Morgan, por toda a prontidão em ajudar, pela preocupação nos dias de experimento, por todos os ensinamentos e por me fazer sentir tão em casa.

- À Cristiane Busnardo, por transmitir todos os ensinamentos necessários para a realização deste trabalho e por ter sido TÃO carinhosa, amorosa e acolhedora desde o primeiro minuto em que nos conhecemos. Muito obrigada por tudo, este trabalho só existe graças a você!

- Aos colegas de laboratório que fiz nestes períodos: Ivaldo, Taíz e Maysa. Muito obrigada pelo acolhimento e pela ajuda nos momentos de desespero.

- À técnica Ivanilda, por ser tão acolhedora e sempre disposta a ajudar.

- Ao Eduardo por todos os conselhos nos momentos de experimento.

- E a todos os outros que conheci nos períodos em que estive em Ribeirão Preto.

Ao biotério da UFLA, laboratório de Fisiologia e todos os funcionários que foram essenciais para que este trabalho fosse realizado.

- Em especial à responsável técnica Samantha, por ser sempre tão solícita e disposta a ajudar. Levarei comigo todos os ensinamentos transmitidos sobre o bem-estar animal e a ética em pesquisa.

- Ao técnico William, por toda ajuda e disponibilidade de sempre.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde e sua secretária, Luciana.

Ao professor Carlos César Crestani (UNESP), por todo auxílio ao longo do desenvolvimento deste trabalho, prontidão em ajudar em todas as fases do trabalho e por ceder seu laboratório para que algumas análises fossem realizadas.

- Ao Ricardo Benini, por toda disponibilidade e por realizar as análises de corticosterona.

Ao professor Renato Leonardo de Freitas (UNIFAL), por toda ajuda com os animais.

Aos membros desta banca:

- Professor Bruno Del Bianco, por todos os ensinamentos ao longo das disciplinas/seminários e banca de qualificação. Por ter sido tão solícito em ajudar nas dificuldades enfrentadas ao longo da execução do trabalho, suas contribuições foram de grande valia. Obrigada por aceitar participar de mais este momento tão importante para mim.

- Professora Roseli Soncini, por ser meu primeiro contato com a ciência e por ter me ensinado tanto no período de graduação. Levo comigo todos os seus ensinamentos sobre pesquisa, respeito e amor aos animais de pesquisa e também sobre a vida. Me espelho em você como profissional, pesquisadora e pessoa. Sou eternamente grata por todos os conselhos e cuidados ao longo destes anos. Muito obrigada por aceitar o convite de participar deste momento tão especial para mim.

Aos amigos que Lavras me trouxe, Marcos, Fernanda, Renata, Jéssica e Sarah. Sem vocês a estadia em Lavras não teria a menor graça, levo cada um em um lugar especial do meu coração.

- À Ana Carolina Godoy, por toda ajuda nos experimentos, por todos os momentos de descontração e por também estar ao meu lado nos momentos de desespero com o experimento. Sua ajuda foi essencial para a finalização deste trabalho. Muito obrigada!

À minha grande amiga Melina. Por ser base e apoio em todos os momentos difíceis do mestrado. Por todos os cafés, almoços e risadas. Por me proporcionar tantos momentos bons e por estar e ser presente há tantos anos em minha vida. Levarei você para sempre comigo!

Às grandes amigas Camila e Luísa, por entenderem toda a minha ausência e desespero. Por serem base fiel de acolhimento e aconchego. Amo vocês!

À minha grande amiga Flávia, por ter me recebido tão bem em Ribeirão Preto, e por ser uma ótima amiga desde a faculdade, você é um presente que a UNIFAL me deu. Obrigada por ser tão presente, amorosa e estar ao meu lado em todos os momentos!

À minha irmã, Larissa, por ter sido tão amorosa, compreensiva e atenciosa. Por ser um misto de mãe e amiga, por ser meu eterno laço aos meus pais e por ser meu grande amor. Te amo, Chilá.

À minha tia e segunda mãe, Jomara, por ser tão presente em todos os momentos de minha vida. Por ser tão cuidadosa e amorosa comigo. Tenho muito orgulho em ser seu clone.

Aos meus pais, por me proporcionarem a vida. Sem vocês eu não nada seria! Honro e agradeço todos os cuidados e amor que dedicaram a mim ao longo de minha vida. Em

especial a minha mãe, por não poupar esforços para que esta jornada fosse possível, por ser tão carinhosa, cuidadosa e companheira. Você sempre será minha maior referência de amor.

E por último, mas com a maior importância, ao João Pedro, por ser minha base em momentos de aflição e também de felicidade. Por ser tão parceiro, amigo e confidente. Por toda ajuda, por ser meu maior conselheiro, por me incentivar em todos os momentos difíceis, em que muitas vezes eu já não enxergava maneiras para continuar, por ser tão incrível ao longo de todos esses anos. Sem você tudo seria mais difícil. Obrigada por tudo e por tanto! Te amo!

RESUMO

O córtex insular (CI) é uma estrutura encefálica envolvida na modulação de atividades autonômicas, como os ajustes do sistema cardiovascular, em situações de estresse. Os neurotransmissores glutamato e óxido nítrico (NO), estão relacionados a diversas funções desempenhadas pelo sistema nervoso central (SNC). Deste modo, o presente estudo tem como objetivo investigar a participação destas duas neurotransmissões (glutamatérgica e nitrérgica) no CI, sobre respostas autonômicas e neuroendócrinas desencadeadas pelo estresse por restrição. Utilizamos dois antagonistas de receptores de glutamato (NMDA: LY235959 e não-NMDA: NBQX) para avaliar a neurotransmissão glutamatérgica. Foram utilizadas três abordagens diferentes para estudar a neurotransmissão nitrérgica: um inibidor seletivo da nNOS (NPLA); um sequestrador de NO (Carboxi-PTIO) e um inibidor específico da guanilato ciclase (ODQ). Todas as drogas foram microinjetadas no CI. A resposta pressora e taquicárdica de animais submetidos ao estresse por restrição, foram potencializadas pelo bloqueio da neurotransmissão glutamatérgica, pela microinjeção de LY235959, assim como o bloqueio da neurotransmissão nitrérgica através da microinjeção de NPLA, Carboxi-PTIO e ODQ. Porém, a neurotransmissão glutamatérgica, mediada por receptores não-NMDA (NBQX), não modificou a pressão arterial e frequência cardíaca. A modulação da queda de temperatura caudal, resposta autonômica característica desencadeada pelo estresse por restrição, não foi alterada pelo bloqueio das neurotransmissões nitrérgica e glutamatérgica, com nenhuma das drogas utilizada. A liberação de glicocorticoides estava diminuída em animais que receberam a microinjeção de NPLA e Carboxi-PTIO. O bloqueio da neurotransmissão glutamatérgica e o uso de um inibidor da guanilato ciclase (GC), não afetou a liberação de corticosterona. Isso sugere que a participação das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica, presentes no CI, ocorre por vias diferentes sobre as respostas cardiovasculares e neuroendócrinas desencadeadas pelo estresse. A neurotransmissão glutamatérgica, através de receptores NMDA, e a neurotransmissão nitrérgica participam da modulação das alterações cardiovasculares de forma inibitória sobre as respostas taquicárdicas e pressórica, que são desencadeadas pelo estresse. Porém, a modulação da liberação de corticosterona pela neurotransmissão nitrérgica ocorre por mecanismos independentes da ativação de receptores NMDA e da GC, mas dependentes de nNOS e da formação de NO.

Palavras-chave: Óxido nítrico. Glutamato. NMDA/NO/GC. Guanilato ciclase. nNOS.

ABSTRACT

Insular cortex (IC) is a brain structure involved in modulating autonomic activity, such as cardiovascular system adjustments in stress situations. Glutamate and nitric oxide (NO) neurotransmitters are associated with several functions performed by the central nervous system (CNS). Thus, the present study aims to investigate the involvement of these two neurotransmissions at IC (i.e., glutamatergic and nitrenergic), on restraint stress-triggered autonomic and neuroendocrine responses. We used two antagonists of glutamate receptor (NMDA: LY235959; and non-NMDA: NBQX) to evaluate glutamatergic neurotransmission effect. We used three different approaches to study nitrenergic neurotransmission: selective nNOS inhibitor (NPLA), NO sequester (Carboxi-PTIO), and specific guanylate cyclase inhibitor (ODQ). All drugs were applied by microinjection in the IC. Pressure and the tachycardic response of animals submitted to restriction stress were potentiated beyond the blockade of glutamatergic neurotransmission by LY235959, as well as the blockade of nitrenergic neurotransmission by NPLA, Carboxi-PTIO, and ODQ. Additionally, glutamatergic neurotransmission by non-NMDA receptors (NBQX) did not alter blood pressure and heart rate. The modulation of the decrease in caudal temperature, a characteristic autonomic response for restraint stress, was not changed by the blockade of nitrenergic and glutamatergic neurotransmission on any used drugs. NPLA and Carboxi-PTIO decrease the Glucocorticoid release. Blockade of glutamatergic neurotransmission and the use of specific guanylate cyclase inhibitor (GC) did not affect corticosterone release. This non-effect suggests that the glutamatergic and nitrenergic neurotransmissions participation on IC occurs in different ways over the cardiovascular and neuroendocrine responses triggered by stress. Glutamatergic neurotransmission, through NMDA receptors, and nitrenergic neurotransmission participate in the modulation of cardiovascular changes, inhibiting the stress-triggered tachycardic and blood pressure increase. However, the modulation of corticosterone release by nitrenergic neurotransmission occurred from independent mechanisms independent of the activation of NMDA receptors and GC, but dependent on nNOS and NO formation, but dependent on nNOS and NO formation.

Keywords: Nitric oxide. Glutamate. NMDA/NO/GC. Guanylate cyclase. nNOS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração da via de ativação de receptores NMDA e cascata de reações NO/GC.	31
Figura 2 - Cronologia dos protocolos experimentais.....	35
Figura 3 - Cronologia do registro de pressão arterial e frequência cardíaca, coleta de sangue e estresse por restrição.	38
Figura 4 - Cronologia de experimento de temperatura caudal.....	39
Figura 5 - Foto de um corte histológico, representativa de sítios de injeção no córtex insular (CI).....	45
Figura 6 - Dispersão dos sítios de injeção de um antagonista de receptores NMDA, LY235959 (Continua).....	46
Figura 7 - Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC), temperatura caudal (Δ TC) e concentração sérica de costicosterona, em animais submetidos ao estresse por restrição (ER) tratados com LY235959.....	49
Figura 8 - Registro representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição, tratados com LY235959.	50
Figura 9 - Representação termográfica da variação da temperatura caudal de animais tratados com LY235959.....	51
Figura 10 - Dispersão dos sítios de injeção de um antagonista de receptores não NMDA, NBQX (Continua).....	52
Figura 11 - Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC), temperatura caudal (Δ TC) e concentração sérica de costicosterona (D), em animais submetidos ao estresse por restrição (ER) e tratados com NBQX.....	55
Figura 12 - Representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição e tratados com NBQX.....	56
Figura 13 - Representação termográfica da variação da temperatura caudal de animais tratados com NBQX.....	57
Figura 14 -Dispersão dos sítios de injeção de um bloqueador da óxido nítrico sintase (NOS), NPLA (Continua).	58

Figura 15: Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura caudal (Δ TC) e concentração sérica de costicosterona, em animais submetidos ao estresse por restrição (ER) e tratados com NPLA.....	61
Figura 16 - Representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição etratados com NPLA.	62
Figura 17: Representação termográfica da variação da temperatura caudal de animais tratados com NPLA.....	63
Figura 18: Dispersão dos sítios de injeção de um sequestrador de óxido nítrico, Carboxi-PTIO.....	64
Figura 19 - Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC)e temperatura caudal (Δ TC) e concentração sérica de costicosterona (D), em animais submetidos ao estresse por restrição (ER) e tratados com Carboxi-PTIO.....	66
Figura 20- Representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição e tratados com Carboxi-PTIO.....	67
Figura 21- Representação termográfica da variação da temperatura caudal de animais tratados com Carboxi-PTIO.....	68
Figura 22 - Dispersão dos sítios de injeção de um inibidor da guanilato ciclase, ODQ...	69
Figura 23 - Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura caudal (Δ TC) e concentração sérica de costicosterona, em animais submetidos ao estresse por restrição (ER) e tratados com ODQ.	71
Figura 24 - Representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição, tratados com ODQ.	72
Figura 25- Representação termográfica da variação da temperatura caudal de animais tratados com ODQ.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores basais de PAM, FC e TC em animais controle e tratados com LY235959.	48
Tabela 2 - Valores basais de PAM, FC e TC em animais controle e tratados com NBQX.	53
Tabela 3 - Valores basais de PAM, FC e TC em animais controle e tratados com NPLA.	59
Tabela 4: Valores basais de PAM, FC e TC em animais controle e tratados com Carboxi-PTIO.....	65
Tabela 5: Valores basais de PAM, FC e TC em animais controle e tratados com ODQ..	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCSF	Líquido cefalorraquidiano artificial
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxozolpropionico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CC	Corpo caloso
CEUA	Comitê de ética em utilização animal
Cg	Córtex cingulado
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CI	Córtex insular
CO	Córtex orbital
CPF	Córtex pré frontal
CPFL	Córtex pré frontal lateral
CPFM	Córtex pré frontal medial
CPFO	Córtex pré frontal orbital
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CVLM	Núcleo caudoventrolateral
EPM	Erro padrão da média
ER	Estresse por restrição
FC	Frequência cardíaca
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GC	Guanilato ciclase
HL	Hipotálamo lateral
HPA	Hipotálamo hipófise adrenal
MC2-R	Receptores de melanocortina do tipo 2
mGLUR	Receptor de glutamato metabotrópico
NA	Núcleo ambíguo
NDV	Núcleo dorsal do vago
NMDA	N-metil-d-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
NOSn	Óxido nítrico sintase neural
NLET	Núcleo do leito da estria terminal
NPV	Núcleo paraventricular
NPLA	N-propil-L-arginina
NTS	Núcleo do trato solitário
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PrL	Córtex pré limbico
rCRH1	Receptor de corticotropina do tipo 1

rCRH 2	Receptor de corticotropina do tipo 2
RVLM	Núcleo rostroventrolateral
SAG	Síndrome de adaptação geral
SNAs	Sistema nervoso autônomo simpático
SNC	Sistema nervoso central
TC	Temperatura caudal

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	19
2 – REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 – Estresse.....	22
2.2 – Eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA)	23
2.3 – Sistema Cardiovascular e Sistema Nervoso Central.....	25
2.4 – Córtex Insular (CI)	27
2.5 – Neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica	29
3 – OBJETIVOS	33
3.1 - Objetivos específicos.....	33
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 – Animais	35
4.2 - Grupos experimentais	35
4.3 - Técnica de implante de cânulas guias no Córtex Insular	36
4.4 - Canulação da artéria femoral.....	36
4.5 - Registro da pressão arterial e frequência cardíaca	37
4.6 - Microinjeção de drogas no Córtex Pré-frontal Lateral	37
4.7 - Estresse por restrição	38
4.8 – Temperatura da cauda	38
4.9 - Soluções e drogas utilizadas.....	39
4.10 - Determinação anatômica dos sítios de injeção de droga no Córtex Insular	39
4.11 – Dosagem corticosterona sérica.....	37
4.12- Análise estatística.....	40
5 – PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	42
5.1 - Estudo da participação do CI nas respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticoides e temperatura cutânea ao estresse por restrição.	42
5.1.1 - <i>Efeito do tratamento do CI com LY235959, um antagonista de receptor NMDA, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição</i>	42
5.1.2 - <i>Efeito do tratamento do CI com NBQX, um antagonista de receptor não-NMDA, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição</i>	42
5.1.3 - <i>Efeito do tratamento do CI com NPLA, um bloqueador da NOS, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição</i>	42
5.1.4 - <i>Efeito do tratamento do CI com Carboxi-PTIO, um sequestrador de NO, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição</i>	42

5.1.5 - Efeito do tratamento do CI com ODQ, um inibidor da guanilato ciclase, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição	43
6 - RESULTADOS	45
6.1 – Determinação do sítio de injeção das drogas.....	45
6.2 - Efeito do tratamento do CI com LY235959, um antagonista de receptor NMDA, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição.....	45
6.3 - Efeito do tratamento do CI com NBQX, um antagonista de receptor não-NMDA, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição.....	52
6.4 - Efeito do tratamento do CI com NPLA, um bloqueador da NOS, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição.....	58
6.5 - Efeito do tratamento do CI com Carboxi-PTIO, um sequestrador de NO, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição.....	64
6.6 - Efeito do tratamento do CI com ODQ, um inibidor da guanilato ciclase, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição.....	69
7 – DISCUSSÃO.....	75
8 – CONCLUSÃO.....	83
9- REFERÊNCIAS.....	85

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular é um dos principais sistemas afetados durante a exposição à agentes estressores, sejam eles ambientais, físicos ou psicológicos. Essa exposição é responsável por desencadear diversas respostas fisiológicas e comportamentais, sendo algumas destas alterações: (i) o aumento de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC);(ii) vasoconstrição cutânea, via ativação do sistema nervoso autônomo simpático, que aumenta a temperatura interna do corpo e diminui a temperatura das extremidades; (iii) ativação de respostas neuroendócrinas, como ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e consequente liberação de glicocorticoides na circulação sistêmica.

O sistema nervoso central (SNC) é essencial para efetivação e controle de todas essas respostas ao estresse. Centros localizados no bulbo são responsáveis por manter o tônus basal da atividade cardiovascular e também por promover adaptações agudas em resposta a ativação de mecanismos reflexos de defesa, como ocorre em perturbações a homeostasia. Além dos centros bulbares, outras áreas do SNC são responsáveis por integrarem as informações aferentes e eferentes, modulando áreas bulbares, para realizarem os ajustes necessários, mantendo a manutenção da homeostasia. Uma destas áreas supra bulbares é o córtex insular (CI).

O CI é conhecido como uma região com amplas conectividades às diversas áreas do SNC, que são responsáveis por modular respostas comportamentais, sensoriais, viscerais, cognitivas e emocionais. Além disso, estudos apontam o CI como um importante centro de integração responsável por modular alterações cardiovasculares durante situações de estresse. Porém, pouco se sabe sobre quais neurotransmissões participam dessas respostas, bem como sobre quais os mecanismos e sítios específicos no SNC estão envolvidos.

A neurotransmissão glutamatérgica é amplamente distribuída pelo SNC, sendo responsável por grande parte das sinapses excitatórias no SNC. Já foi descrito a existência de terminais glutamatérgicos no CI e a participação do neurotransmissor glutamato em respostas cardiovasculares desencadeadas pela microestimulação dessa área. Além disso, a neurotransmissão glutamatérgica presente no CI já foi apontada como modulatória da função barorreflexa. O receptor NMDA de glutamato apresenta grande relação com a produção de óxido nítrico (NO) após sua ativação. Após ativação de receptores NMDA para glutamato, ocorre a formação de NO pela ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o NO formado atinge a membrana pré-sináptica e por mecanismos dependentes de GMPc e guanilato ciclase

(GC), leva a liberação de neurotransmissores. Além disso, o NO pode atuar no SNC como um neurotransmissor atípico. Em outras áreas do SNC, a via NMDA/NO/GC está envolvida na modulação do sistema cardiovascular em diferentes situações, incluindo em situações de estresse. Desta forma, esse trabalho se propôs a avaliar se as neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica presentes no CI são responsáveis por modularem respostas autonômicas e neuroendócrinas desencadeadas pela exposição ao estresse agudo por restrição em ratos.

REFERENCIAL TEÓRICO

2 – REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 – Estresse

O termo estresse, tomado de empréstimo da física, foi empregado por Hans Selye para descrever estresse como *“estado manifestado por uma síndrome específica que consiste em todas as alterações não específicas induzidas dentro de um sistema biológico”*, ou seja, diversos tipos de agentes estressores podem desencadear o mesmo tipo de resposta fisiológica ou até respostas distintas no organismo. Para Selye, esta resposta resulta de uma série de ajustes fisiológicos, determinados por ele como Síndrome de Adaptação Geral (SAG). Esta síndrome passa por três fases, respondendo a algum agente estressor. As fases são: reação de alarme, estágio de resistência e estágio de exaustão (SELYE, 1956). Na primeira, o organismo se prepara para uma reação de luta ou fuga, adaptando o corpo para enfrentar o possível “ataque”, onde respostas são ativadas pelo sistema nervoso autônomo simpático (SNAs), mediando a liberação de neurotransmissores em diversos órgãos-alvo, além de estimular as glândulas adrenais a liberarem hormônios catecolaminérgicos (adrenalina e noradrenalina). A segunda fase se instala se o estímulo estressor permanece, iniciando a adaptação do corpo para manter o equilíbrio interno, o que denomina-se: alostase. Isso ocorre a partir de respostas comportamentais e fisiológicas, com intuito de reestabelecer homeostase, mediadas principalmente pelo cortisol, hormônio esteroide liberado e sintetizado pelo córtex da adrenal, após ativação do eixo HPA. Na última fase, se estímulo estressor permanece e o organismo não consegue adaptar-se, respondendo com mecanismos fisiológicos e comportamentais iguais aos da primeira fase, porém, de maneira acentuada, demandando grande gasto energético, podendo levar o sistema à exaustão, ou falha da alostase (CUNANAN et al., 2018; SELYE, 1951, 1975; SZABO; TACHE; SOMOGYI, 2012).

Além dos estressores físicos e químicos, fatores psicológicos como novidade ou problemas sociais, também são aceitos como agentes estressores capazes de induzir alterações comportamentais e fisiológicas significativas (MCEWEN, 2000). As respostas aos estressores podem variar, dependendo no nível de previsibilidade, intensidade, duração e natureza do estímulo estressor (HERMAN et al., 2016). Esta resposta é mediada, principalmente, pelo hipotálamo, área do SNC de controle visceral e hormonal, ativando o SNAs e o eixo HPA (MCEWEN; SEEMAN, 1999). Uma revisão de literatura listou as principais alterações comportamentais e fisiológicas desencadeadas durante o estresse agudo. As alterações comportamentais são: aumento da atenção, cognição, analgesia e temperatura; alterações do

apetite e alimentação; supressão ou ativação do eixo reprodutivo. E as mudanças fisiológicas vão desde a redistribuição de oxigênio e nutrientes ao SNC e órgãos, alteração do tônus vascular, aumento da frequência respiratória, aumento de gliconeogênese e lipólise até a inibição da digestão (CHARMANDARI; TSIGOS; CHROUSOS, 2005). Além da liberação de glicocorticóides pela adrenal, como consequência da ativação do eixo HPA (HERMAN; CULLINAN; HERMAN, 1997). Isso tudo a fim de preparar o indivíduo para enfrentar o agente estressor de maneira eficiente e reestabelecer o equilíbrio interno.

O estresse por restrição (ER) é um modelo clássico de estresse, padronizado na literatura como um estímulo aversivo, não-condicionado e inescapável (BARRON; VAN LOON, 1989; CHOI et al., 2007; FASSINI et al., 2014, 2015a; MCEWEN et al., 2015; TSAI et al., 2015; VAN DER KOOIJ et al., 2014; VAREJKOVA; JANISOVA; MYSLIVECEK, 2019; XU et al., 2019; ZHANG et al., 2015). Esse modelo vem sendo apontado como responsável por alterações morfológicas na barreira hematoencefálica (SÁNTHA et al., 2016), além de alterações da permeabilidade e danos a esta barreira (XU et al., 2019). Também é responsável por desencadear respostas neuroendócrinas e cardiovasculares (BARRON; VAN LOON, 1989; CHOI et al., 2007), estas últimas caracterizadas por aumento sustentado da PA e FC durante todo o período de estresse (ALVES; CRESTANI; CORRÊA, 2010; BARRON; VAN LOON, 1989; BENINI et al., 2019; FASSINI et al., 2015a; MCDUGALL et al., 2000), levando ao aumento do fluxo sanguíneo para os órgãos-alvo; bem como a alteração do biorritmo da FC no período pós estresse (VAREJKOVA; JANISOVA; MYSLIVECEK, 2019). Além disso, o ER reduz o fluxo para os leitos cutâneos, levando a diminuição da temperatura cutânea e ao aumento da temperatura interna (BLESSING; SEAMAN, 2003; NAKAMURA; NAKAMURA, 2015; VIANNA; CARRIVE, 2005).

2.2 – Eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA)

Os glicocorticóides atuam, de maneira geral, para preparar o organismo para desafios fisiológicos, ambientais e psicológicos. Uma das principais funções é a redistribuição energética para otimizar a sobrevivência e enfrentar um “desafio” (HERMAN et al., 2016), por isso, são importantes para a consolidação da resposta ao estressor (PEETERS; BROWKKAMP, 1994). Durante a homeostasia, três estruturas são responsáveis por orquestrar a liberação de glicocorticóides, são elas: núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo, a adeno-hipófise e o córtex da glândula adrenal, mais conhecido como eixo HPA (SMITH;

VALE, 2006). Os mecanismos pelos quais este eixo atua, começam com a estimulação de neurônios noradrenérgicos situados no NPV do hipotálamo (YOUNG, 2001), levando a síntese e secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) (RIVIER; VALE, 1983). Este hormônio é liberado na eminência mediana e levado pelos vasos porta hipofisários para a adeno-hipófise, o CRH liga-se a dois tipos de receptores de corticotropina, do tipo 1 (rCRH1) e tipo 2 (rCRH2). Esta ligação leva à síntese e liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação sistêmica. Na zona fasciculada do córtex adrenal, o ACTH liga-se aos receptores de melanocortina do tipo 2 (MC2-R), levando à síntese e liberação dos glicocorticóides na circulação sistêmica (BURFORD; WEBSTER; CRUZ-TOPETE, 2017).

Os complexos receptores-glicocorticóides resultam, na sua grande maioria, em respostas sistêmicas lentas. Estas respostas podem ser: aumento da glicemia, direcionamento de aporte energético para as funções essenciais a situações de “luta ou fuga” (sensoriais, cognitivas e motoras) e ao melhoramento do sistema respiratório e cardiovascular. Além disso, algumas funções podem ser inibidas, como digestão, crescimento e percepção a dor (FALKENSTEIN et al., 2000). Algumas respostas rápidas também acontecem a partir da ligação de glicocorticóides à receptores de membrana, alterando liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, levando às alterações na excitabilidade neuronal (MORA et al., 2012; RIEDEMANN et al., 2010).

A finalização da resposta ao estresse ocorre com a retirada do estímulo estressor, através de mecanismos de retroalimentação negativa (JOËLS; BARAM, 2009; LAI; HERMAN, 2009). A persistência e a intensidade exagerada do estresse, podem tornar o eixo hiper-reativo, com prejuízos potenciais ao organismo, como por exemplo: alterações no metabolismo e sistema cardiovascular (BURFORD; WEBSTER; CRUZ-TOPETE, 2017; HUETHER et al., 1999). O mecanismo de feedback negativo da ativação do eixo HPA sofre influência de outras diversas áreas do SNC. Algumas estruturas límbicas são responsáveis pela inibição neural do eixo na resposta ao estresse, incluindo o hipocampo (JACOBSON; SAPOLSKY, 1991) e o córtex pré frontal medial (CFPM) (LAI; HERMAN, 2009). Estas estruturas parecem trabalhar em paralelo, visto que inervam regiões subcorticais comuns, como o núcleo do leito da estria terminal. Lesões combinadas destas duas regiões levaram à efeitos aditivos na hiperatividade do eixo HPA (RADLEY; SAWCHENKO, 2011).

Os mecanismos neurais da ativação do eixo HPA por estresse agudo ainda não são completamente entendidos. Estudos apresentam evidências de que os neurônios do NPV dorso medial, responsáveis por liberar CRH, podem ser ativados por outras áreas do cérebro como o

núcleo do trato solitário (NTS) e região ventrolateral do núcleo do leito da estria terminal (NLET), para comunicar o desafio homeostático. Áreas corticais como a região infralímbica do CPFM, também parece exercer excitação transsináptica importante para a resposta ao estímulo estressor (HERMAN et al., 2016).

2.3 – Sistema Cardiovascular e Sistema Nervoso Central

O estresse e suas consequências para o organismo parecem ser um dos principais fatores ambientais que predisõem um indivíduo à depressão. Em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes, principalmente de origem psicossocial (KRAUS et al., 2019; MAYDYCH, 2019; POST, 1992). Estudos tem demonstrado a relação da depressão e patologias cardiovasculares (BETZ et al., 2016; HUETHER et al., 1999; LUGOBONI et al., 2005; MCCONNELL et al., 2005; PLANTE, 2005; RUMSFELD; HO, 2005; STEPTOE; KIVIMÄKI, 2012; VACCARINO et al., 2019). Este fato torna a pesquisa dos mecanismos neurais modulatórios do sistema cardiovascular, imprescindível para entender a gênese das enfermidades psiquiátricas ou físicas/cardiovasculares causadas por ele.

Os mecanismos fisiopatológicos da depressão ainda não são totalmente elucidados, tratando-se de uma síndrome multifatorial e heterogênea, de etiologias distintas (YANG et al., 2015). Embora ainda não se saiba exatamente em quais áreas do cérebro ocorrem as alterações que levam à depressão, sabe-se de diversas áreas que podem influenciar nesta síndrome, entre elas: áreas corticais como o córtex pré-frontal, córtex cingulado e até mesmo o CI (BERTON; NESTLER, 2006; GEHRLACH et al., 2019; SLIZ; HAYLEY, 2012; SPRENGELMEYER et al., 2011; YANG et al., 2015). Contudo, ainda existe uma lacuna na literatura sobre os mecanismos fisiológicos pelos quais estas áreas exercem algum tipo de influência. Diversas teorias são aceitas, entre elas destacam-se a de receptores de glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC, e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), proteína importante na neurogênese e plasticidade sináptica (YANG et al., 2015). Pacientes com depressão apresentaram altos níveis de glutamato no cérebro e plasma (DOMIN et al., 2014; HASHIMOTO, 2011), visto que a exposição a fatores estressores leva a liberação de glutamato nos neurônios pré-sinápticos (DUMAN; VOLETI, 2012; HASHIMOTO, 2011). Além disso, já foi demonstrado que após eventos estressantes, o BDNF é menos expresso em estruturas límbicas como hipocampo, amígdala e CPF, levando à diminuição da neurogênese hipocampal (DUMAN; MONTEGGIA, 2006).

Ao expor um indivíduo à agentes estressores, tanto fisiológicos quanto psicológicos, ocorre desbalanço da homeostase de diversos sistemas biológicos, como o sistema cardiovascular, imunológico, endócrino e do SNC (YARIBEYGI et al., 2017). Para responder a estas alterações, ocorre a ativação de mecanismos que integram componentes do SNC com os outros sistemas, a fim de reestabelecer o equilíbrio das funções fisiológicas (SELYE, 1956). O sistema cardiovascular possui papel imprescindível na homeostase corporal, sendo responsável por controlar a distribuição de nutrientes e moléculas essenciais ao funcionamento de todos os tecidos, através do fluxo sanguíneo (VERBERNE et al., 1997). A homeostase é fundamental para manter as funções corporais em equilíbrio e pode ser caracterizada como manutenção de propriedades químicas e físicas do fluido extracelular em todos os tecidos (DAMPNEY, 2016). Este controle ocorre através de ajustes no débito cardíaco e resistência periférica total, regulando o volume sanguíneo central e pressão arterial média. Sendo assim, a pressão arterial média é especialmente responsável por garantir a perfusão adequada de órgãos vitais (KIMMERLY, 2017).

O SNC atua diretamente no controle do sistema cardiovascular (DAMPNEY, 2017). Centros bulbares são responsáveis pela manutenção do tônus basal e por adaptações agudas desse sistema (GOLDSTEIN, 1991), são exemplos destes centros: NTS, núcleo ambíguo (NA), núcleo dorsal do vago (NDV) e os núcleos rostroventrolateral (RVLM) e caudoventrolateral (CVLM) (GOLDEINSTEIN, 1992). Neurônios do RVLM alteram a frequência de descarga dos neurônios pré-ganglionares simpáticos responsáveis pela manutenção do tônus vascular e pelos componentes simpáticos dos reflexos cardiovasculares (GUYENET, 2006). O NA e NDV desencadeiam as respostas parassimpáticas eferentes (MCALLEN; SPYER, 1976) como reflexos cardiovasculares, barorreflexo arterial, quimiorreflexo e reflexo cardiopulmonar, que permitem os ajustes instantâneos necessários na PA (TAYLOR; JORDAN; COOTE, 1999). Além das estruturas bulbares, regiões suprabulbares também participam da regulação do sistema cardiovascular. A modulação exercida por áreas suprabulbares ocorre principalmente em situações comportamentais, incluindo situações de estresse, proporcionando a integração de funções vegetativas e somatomotoras, desencadeando alterações cardiovasculares caracterizadas por aumento da PA e FC. Algumas dessas estruturas são: hipotálamo, amígdala, área septal e algumas regiões específicas do córtex cerebral, como o CI (ALVES et al., 2011, 2013a; DAMPNEY, 1994; LOEWY, 1991; LOEWY; MCKELLAR, 1980). Apesar do córtex cerebral ser uma área evolutivamente mais recente, diversos estudos comprovam a ligação de áreas corticais com

estruturas evolutivamente mais antigas, como a amígdala, hipotálamo e hipocampo (GOGOLLA, 2017).

2.4 – Córtex Insular (CI)

O CI é parte integrante do córtex pré-frontal (CPF), topograficamente subdividido em três principais regiões. Primeira, o CPFM que constitui a maior porção da parede medial do hemisfério anterior e dorsal do corpo caloso (CC). A segunda, que se localiza na porção dorsal da extremidade caudal do bulbo olfatório que é denominada córtex pré-frontal orbital (CPFO). Terceira, localizada lateralmente que é referido como córtex pré-frontal lateral (CPFL), ou CI, que é o objeto de estudo deste trabalho (PAXINOS; WATSON, 1997). Em primatas antropóides, está localizado em um lobo cortical separado e lateral ao prosencéfalo, abaixo do sulco lateral, coberto pelo opérculo frontoparietal e ventralmente pelo opérculo temporal (EVRARD, 2019). Em ratos, o CI ou CPFL é localizado na parte inferior do sulco rinal e se estende rostralmente aos níveis do bulbo olfatório e caudalmente aos níveis da amígdala, é uma região límbica, que integra informação sensorial e visceral de receptores periféricos e têm sido apontado como centro modulador no controle da atividade autonômica (ALEKSANDROV; ALEKSANDROVA, 2015; ANAND; DUA, 1956; CECHETTO, 2014; DELGADO, 1960; MEYER; STRITTMATTER; FISCHER, 2004). É subdividido de acordo com sua citoarquitetura em granular, agranular e disgranular. Considerado centro de integração multimodal, possui amplas conectividades com regiões corticais e subcorticais, responsáveis por funções sensoriais, cognitivas, emocionais, motivacionais e neuromodulatórias (GOGOLLA, 2017).

As primeiras evidências do envolvimento específico do CI na modulação da atividade cardiovascular, foram demonstradas com estimulação elétrica dessa estrutura (HARDY; HOLMES, 1998; HARDY; MACK, 1990; RUGGIERO et al., 1987; YASUI et al., 1991). Foi demonstrado também, que a estimulação química do CI em ratos anestesiados desencadeia respostas cardiovasculares, uma vez que a microinjeção do aminoácido excitatório ácido D,L-homocisteico no CI causa tanto aumento quanto diminuição na PA e FC, dependendo da região estimulada (YASUI et al., 1991), enquanto que em animais não anestesiados causa aumento da PA e diminuição na FC (BUTCHER; CECHETTO, 1995) sugerindo dessa forma o envolvimento desta estrutura na modulação do sistema cardiovascular.

O CI atua na modulação do sistema cardiovascular através de diversos mecanismos. Após lesões com cloridrato de fenilefrina e nitroprussiato de sódio no CI esquerdo, foram

capazes de aumentar o ganho do barorreflexo. No CI direito, após os mesmos tipos de lesões, a FC e PA basais aumentaram mas não ocorreu aumento do ganho barorreflexo (ZHANG; RASHBA; OPPENHEIMER, 1998). Um estudo com macacos, encontrou cerca de 131 unidades de neurônios relacionados aos mecanismos de barorreceptores no CI, variando entre neurônios simpato-excitatórios, simpato-inibitórios e unidades nulas, além de apresentar maior quantidade de unidades barorreceptoras em relação às áreas que o circundam (ZHANG; DOUGHERTY; OPPENHEIMER, 1998). Foram identificadas conexões neurais responsáveis por conduzir impulsos aferentes de quimiorreceptores, barorreceptores e receptores de estiramento pulmonar no CI, sugerindo que o CI recebe informações integrativas oriundas da periferia para montar ou modular respostas cardiovasculares (CA et al., 2000; HANAMORI et al., 1998). Outros estudos corroboram para a teoria de que o CI modula as respostas barorreflexas. Em um destes, a neurotransmissão noradrenérgica presente no CI exerceu influência inibitória sobre as respostas barorreflexas evocadas pela infusão de fenilefrina, uma vez que o antagonismo de receptores α_1 adrenérgicos, aumentou as respostas bradicárdicas durante respostas de aumento de PA (ALVES et al., 2009a). Foi demonstrado também que a neurotransmissão glutamatérgica no CI, mediada por receptores NMDA, também modula atividade barorreflexa de forma excitatória, uma vez que ao antagonizar receptores NMDA ocorre a diminuição das respostas bradicárdicas, frente as respostas de aumento de PA (ALVES et al., 2009b), além de ser caracterizado como uma importante área modulatória da atividade parassimpática (NAGAI et al., 2016).

Estudos utilizando técnicas de análise de imagens e medidas de expressão de proteína *Fos* demonstraram ativação de estruturas cerebrais envolvidas no controle autonômico durante situações de estresse, incluindo o CI (AHN et al., 2015; IMBE et al., 2013; UEMATSU et al., 2015). Diversos estudos apontam evidências acerca do envolvimento CI nos ajustes cardiovasculares durante diferentes situações de estresse, incluindo o estresse por restrição (ALVES et al., 2013b; ALVES; CRESTANI; CORRÊA, 2010). Em particular, um estudo demonstrou que o bloqueio de toda a neurotransmissão presente no CI pela microinjeção de cloreto de cobalto CoCl_2 diminuiu as respostas de aumentos na PA e FC decorrentes do estresse por restrição (ALVES; CRESTANI; CORRÊA, 2010), sugerindo dessa forma a participação dessa área cortical na modulação da atividade cardiovascular durante situações de estresse, embora as neurotransmissões envolvidas nessa modulação ainda não sejam conhecidas.

2.5 – Neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica

O glutamato é um dos principais neurotransmissores excitatórios no SNC (FLECK et al., 1993; KHODOROV, 2004) podendo atuar em diferentes tipos de receptores metabotrópicos e ionotrópicos (PRAST; PHILIPPU, 2001; TRABACE; KENDRICK, 2000; ZHOU; ZHU, 2009). Os receptores ionotrópicos são canais iônicos dependentes de ligante que ao serem estimulados promovem a neurotransmissão excitatória rápida. Esta categoria de receptores engloba o N-metil-d-aspartato (NMDA), Alfa-Amino-3-Hidroxi-Metil-5-4-Isoxozolpropiônico (AMPA) e cainato. Receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) são acoplados à proteína G que, após a ligação do neurotransmissor, ocorre o desacoplamento desta proteína desencadeando uma cascata de reação de segundos mensageiros intracelulares (HANSEN et al., 2018; MAZZITELLI et al., 2018; PIN; GALVEZ; PRÉZEAU, 2003; RIBEIRO; PIRES; FERGUSON, 2011; ROUSSEAU, 2008; SCHEEFHALS; MACGILLAVRY, 2018). Foi demonstrado a presença de terminais glutamatérgicos no CI (DORI et al., 1992) e que a microinjeção de glutamato no CI causa respostas cardiovasculares (BUTCHER; CECHETTO, 1995; RANJBAR; HATAM; NASIMI, 2015; RUGGIERO et al., 1987), evidenciando a neurotransmissão glutamatérgica presente no CI participando da modulação da atividade cardiovascular. Além disso, receptores NMDA de glutamato modulam a atividade barorreflexa excitatória mediada pelo CI (ALVES et al., 2009b).

O óxido nítrico (NO) age no SNC como uma molécula de sinalização, e tem sido considerado um neurotransmissor atípico (PRAST; PHILIPPU, 2001; TRABACE; KENDRICK, 2000; ZHOU; ZHU, 2009). É um gás sintetizado em mamíferos por enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS), a partir de L-arginina. É um importante neuromodulador da comunicação celular excitatória, visto que o neurotransmissor mais abundante do SNC, glutamato, inicia uma reação responsável por formar NO (WANG et al., 2005). Garthwaite et al. (1988) demonstraram a relação entre a ativação do receptor NMDA, a isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (NOS_n) e a guanilato ciclase (GC), enzima que catalisa a produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). A ativação dos receptores NMDA presentes em neurônios pós-sinápticos no SNC levam ao influxo de íons Ca²⁺ através deste receptor (GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1998) ativando a nNOS (DO et al., 2002; GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1998; GRIFFITH; STUEH, 1995) e levando à consequente formação de NO, ativando a GC (TAQATQEH et al., 2009), que pode modular a liberação de diversos tipos de neurotransmissores. O NO formado pela ação de nNOS é apontado como neurotransmissor

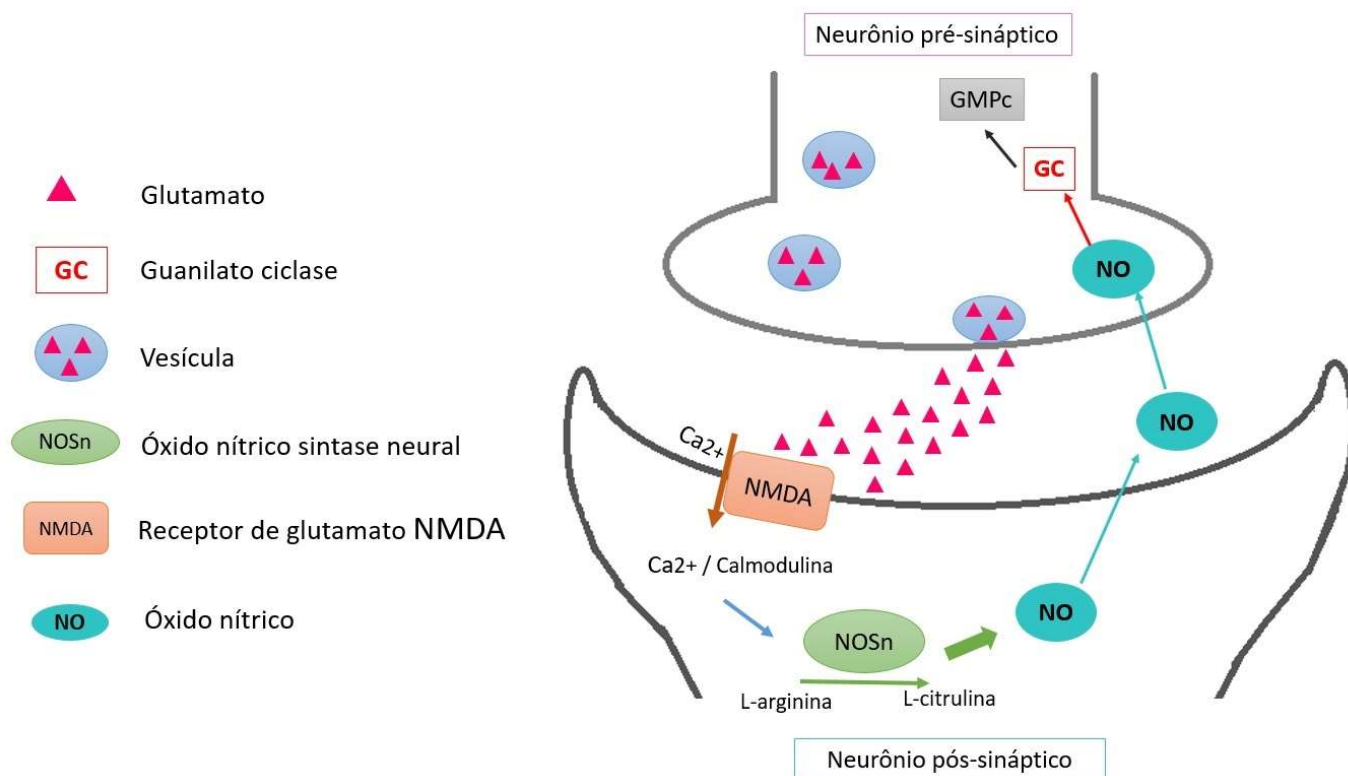
importante nos processos de regulação do fluxo sanguíneo do SNC (GARRY et al., 2015; TODA; OKAMURA, 2003), plasticidade neuronal, formação de memória e liberação de neurotransmissores (SCHUMAN; MADISON, 1994) e mielinização neuronal no cérebro em desenvolvimento (OLIVIER et al., 2010).

Estudos têm indicado um envolvimento da via NMDA/NO/GC na modulação do sistema cardiovascular em diversas estruturas do SNC, em diferentes situações inclusive durante situações de estresse (CAMARGO et al., 2013; FASSINI et al., 2015b; LISBOA et al., 2015; LO et al., 2018; MACHADO et al., 2016). A interação dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico vem sendo caracterizado como um sistema extremamente ativo no controle de diversos sistemas regulatórios, tanto autonômicos como comportamentais, durante situações de estresse (LISBOA et al., 2013, 2015; ZHOU et al., 2011). A sinalização NO/GC no córtex somatossensorial de camundongos, através da via da guanilato ciclase1 (CG1), modula a liberação de dois neurotransmissores essenciais para SNC, GABA e Glutamato (WANG et al., 2017).

Estudos pré-clínicos têm sugerido que os sistemas glutamatérgico e nitrérgico podem ter implicações clínicas em tratamentos como: drogas antiepiléticas (CHAPPELL et al., 2002), antidepressivas (NICIU et al., 2014), em doenças neurodegenerativas como Parkinson, Huntington (GALPERN et al., 1996; JENNER; OLANOW, 1996), entre outras. Demonstrando a importância do entendimento dos mecanismos regulatórios dessas neurotransmissões tão complexas.

Baseado nas evidências acima, o presente estudo se propôs a investigar se as neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica presentes no CI de ratos, modula as respostas autonômicas observadas durante o estresse por restrição, entre elas: alterações cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea caudal dos animais.

Figura 1 - Ilustração da via de ativação de receptores NMDA e cascata de reações NO/GC.



Legenda – No neurônio pré-sináptico ocorre a despolarização da membrana pré-sináptica, levando a exocitose das vesículas contendo glutamato. Após liberado na fenda sináptica, o glutamato interage com seu receptor do tipo NMDA e leva ao influxo de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico. O complexo Ca^{2+} / Calmodulina ativa a enzima óxido nítrico sintase neural (NOSn), que a partir da biossíntese de L-arginina em L-citrulina, forma o óxido nítrico (NO). Uma vez formado, o NO se difunde pela membrana pós sináptica e atua de forma retrógrada no neurônio pré-sináptico, interagindo com a guanilato ciclase (GC), que através de reações dependentes de GMPc, leva à exocitose de novas vesículas contendo glutamato e assim, o ciclo se repete.

Fonte: Da Autora (2020).

OBJETIVOS

3 – OBJETIVOS

O objetivo geral foi avaliar se as neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica presentes no CI integram um circuito central envolvido no controle de respostas autonômicas e neuroendócrinas associadas à exposição ao estresse.

3.1 - Objetivos específicos

1. Avaliar a participação da neurotransmissão glutamatérgica no córtex insular sob as respostas cardiovasculares, na liberação de glicocorticoides e temperatura cutânea desencadeadas pelo estresse por restrição, através da microinjeção local de antagonistas específicos dos receptores de glutamato NMDA (LY235959) e não NMDA (NBQX);

2. Avaliar a participação da neurotransmissão nitrérgica no córtex insular, sob as respostas cardiovasculares, na liberação de glicocorticoides e temperatura cutânea desencadeadas pelo estresse por restrição, através da microinjeção local de um inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neural (NPLA), um sequestrador de NO (Carboxi-PTIO) e um inibidor específico da formação de guanilato ciclase (ODQ)

MATERIAIS E MÉTODOS

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Animais

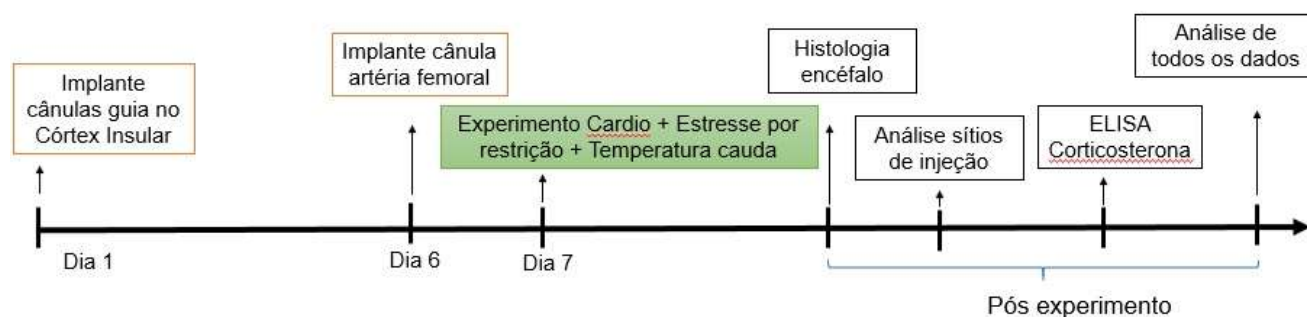
Foram utilizados 48 ratos Wistar pesando entre 280-340 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Lavras e mantidos durante todo o tempo de experimento em caixas plásticas, sendo alimentados com ração granulada e água *ad libidum*. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Lavras, processo (025/2016) e segue as normas da comissão de ética em utilização animal (CEUA) e está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 - Grupos experimentais

- aCSF– Líquido cefalorraquidiano artificial;
- LY235959 – antagonista de receptor de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato);
- NBQX – antagonista de receptor de glutamato não-NMDA (N-metil-D-aspartato);
- N-propil-l-arginina (NPLA) – inibidor específico da nNOs (óxido nítrico sintase neural);
- Carboxi PTIO – sequestrador de NO (óxido nítrico);
- ODQ - inibidor específico da formação da guanilato ciclase.

4.3 - Protocolos experimentais

Figura 2 - Cronologia dos protocolos experimentais



Legenda – No dia 1, foram realizadas as cirurgias estereotáxicas para implante de cânulas guia no córtex insular. No dia 6 ocorreram as cirurgias para implante de cânula na artéria femoral dos ratos. No sétimo dia, ocorreu o experimento de registro de pressão arterial e frequência cardíaca, estresse

por restrição e fotos de temperatura caudal. Posteriormente ao experimento, os animais foram eutanasiados e o encéfalo foi removido. Após, foram feitas as histologias do encéfalo, análises dos sítios de injeção no córtex insular, análise de ELISA para corticosterona sérica e por fim, análise e processamento de todos os dados obtidos.

4.4 - Técnica de implante de cânulas guias no Córtex Insular

Sete dias antes dos experimentos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol na dose de 250 mg/ kg, i.p. Após tricotomia na cabeça, os animais foram imobilizados em um estereotáxico (Stoelting, USA) e a calota craniana exposta por meio de uma incisão na pele. O periósteo foi retirado e todo o tecido com H₂O₂ a 10%. Cânulas guias foram implantadas bilateralmente no CI. Os parâmetros para implantação das cânulas no CI serão: ântero-posterior, +3,2 mm em relação ao bregma; lateral, + 3,75 mm a partir do Bregma; vertical, - 4,5 mm em relação ao osso craniano; com inclinação lateral de 0° e Incisivo = -3,2 mm. Todas as coordenadas para implantação das cânulas tiveram como referência parâmetros do Atlas de Paxinos & Watson (PAXINOS; WATSON, 1997). Foram utilizadas cânulas de aço inoxidável com 11 mm de comprimento e 0,55 mm de diâmetro externo. As cânulas foram fixadas ao crânio com resina acrílica autopolimerisável. Um mandril de 0,2 mm de diâmetro foi introduzido nas cânulas para evitar a obstrução das mesmas durante o período de recuperação dos animais. Como medida profilática, após a cirurgia os animais receberam 80.000 UI de Pentabiótico Veterinário (Fontoura-Wyeth, Brasil) aplicados em 0,2 mL por via intramuscular. Os animais também receberam 2,5 mg/kg do analgésico não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brasil), por via subcutânea, para analgesia pós-operatória.

4.5 - Canulação da artéria femoral

Vinte e quatro horas antes dos experimentos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol na dose de 250 mg/Kg i.p., e implantou-se um cateter na artéria femoral de cada animal. Este vaso foi dissecado e um cateter de polietileno introduzido até a artéria aorta abdominal inferior. O cateter é constituído por um segmento de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldado a segmento de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina), e obstruído com pino de metal. Após implantação do cateter, este foi exteriorizado na região dorsal do animal e fixado à pele por sutura cirúrgica. Ao término da cirurgia, os animais receberam 2,5 mg/ kg do analgésico não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brasil), por

via subcutânea, para analgesia pós-operatória. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro dos parâmetros cardiovasculares basais.

4.6 - Microinjeção de drogas no Córtex Pré-frontal Lateral

As agulhas injetoras (33 G, Small Parts, EUA) que foram utilizadas para microinjeção das drogas no CI, de um milímetro mais longa do que a cânula guia fixada ao crânio, e foram conectadas a uma seringa de 2 µl (Hamilton, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10). As drogas foram injetadas no volume de 100 nL (ALVES et al., 2013b; HAN et al., 2015).

4.7 - Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão. Registrou-se a a pressão arterial pulsátil utilizando um amplificador de sinais AECAD04F (Solução Integrada Comercial LTDA M.E., Brasil), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (Solução Integrada Comercial LTDA M.E., Brasil). Os valores de pressão arterial média (PAM) e FC foram derivados da pressão arterial pulsátil e processados on-line através do software AcqKnowledge 3.8.1.

Os experimentos foram realizados 24 h após a implantação do cateter na artéria femoral. Os animais foram mantidos na sala de experimentação por 60 minutos antes do início do experimento, para habituação às condições de som e iluminação da sala. Dez minutos de registro basal de PAM e FC foram realizados antes do início dos experimentos

4.8 – Dosagem corticosterona sérica

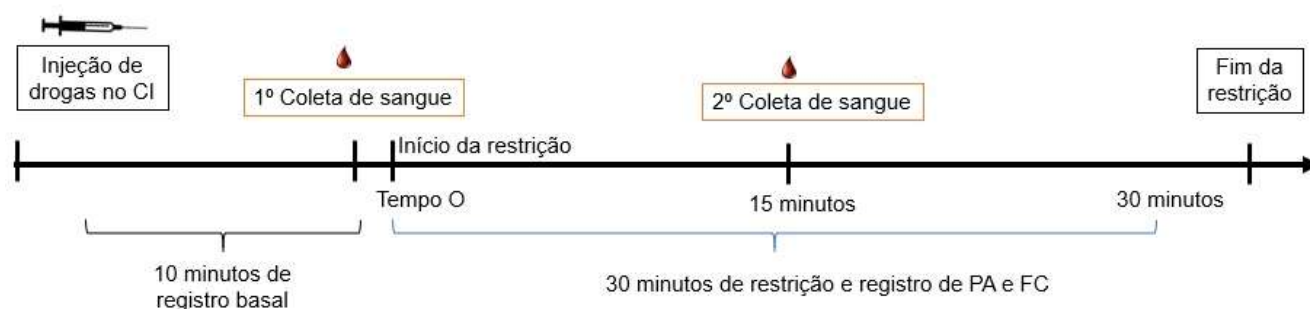
O sangue foi coletado diretamente da artéria femoral, através da cânula inserida na mesma anteriormente. A primeira amostra de sangue foi coletada para medir o valor basal do hormônio (animais não-estressados). A seguir, após 15 minutos do início do estresse por restrição, uma nova amostra foi retirada. O volume retirado foi de 0,3 ml por cada retirada e este mesmo volume foi recuperado com a injeção de salina heparinizada. As amostras foram armazenadas em tubos plásticos de 0,5 ml. Para a obtenção do soro, as amostras permaneceram em temperatura ambiente por 1 hora para a retração do coágulo, sendo posteriormente centrifugadas a 2000xg por 15 min. Após a centrifugação, o soro foi separado e estocado em freezer -80°C para posterior análise. A corticosterona sérica foi mensurada por ensaio

imunoenzimático (ELISA) utilizando kit comercialmente disponível (Cayman chemical, Michigan-USA).

4.9 - Estresse por restrição

O tubo de restrição forçada é constituído por um segmento de PVC com assoalho plano, elevado a 5 cm do chão, medindo 15 cm de comprimento e 6,5 cm de diâmetro, permitindo assim, a imobilização do animal em posição normal. O rato permaneceu no tubo por 30 minutos, e a pressão arterial foi registrada 10 min antes de ser colocado no tubo de restrição em sua *home cage*, e durante todo o período da permanência do animal no tubo.

Figura 3- Cronologia do registro de pressão arterial e frequência cardíaca, coleta de sangue e estresse por restrição.



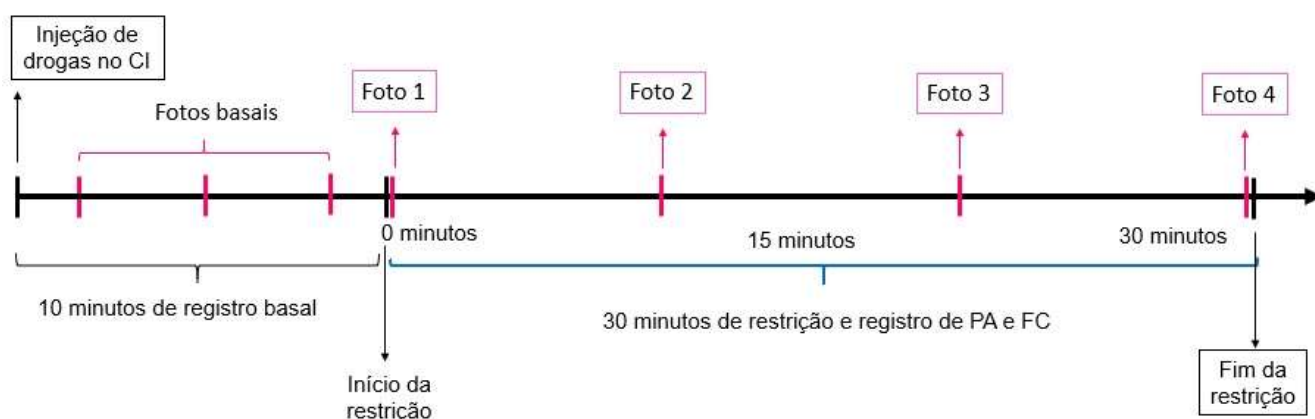
Legenda – Os animais foram conectados ao aparelho de registro de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), receberam injeção das drogas através das cânulas guias implantadas anteriormente no CI. O registro basal consistiu em 10 minutos, onde os animais estavam em suas *home-cage*. Após os 10 minutos, foi retirada a primeira amostra de 0,3mL de sangue (amostra pré-estresse) pela cânula implantada na artéria femoral dos ratos. Imediatamente após a retirada, os animais foram colocados no tubo de restrição e permaneceram por 30 minutos no tubo e conectados ao registro de PA e FC. Após 15 minutos na restrição, retirou-se a segunda amostra de sangue (amostra pós-estresse) .

4.10 – Temperatura da cauda

A temperatura cutânea, especificamente da cauda dos animais, foi registrada utilizando câmera térmica Multi-Purpose Thermal Imager IRI 4010 (Infra Red Systems Ltd Park Circle, Tithe Barn Way Swan Valley Northampton, USA) a uma distância de 50 cm. Medidas com intervalo de 3 minutos durante o registro basal de PA e FC e, após a injeção das drogas, uma

foto a cada dez minutos a partir do período que o animal entrou no tubo, sendo a primeira medida no tempo 0 de restrição e a última assim que completaram 30 minutos de restrição.

Figura 4 - Cronologia de experimento de temperatura caudal.



Legenda – Durante o registro basal (10 minutos anteriores ao estresse por restrição), foram tiradas 3 fotos térmicas com intervalo de 3 minutos de uma foto para outra. Após o início do estresse por restrição, foram tiradas mais 4 fotos, com intervalo de 10 minutos entre as fotos, com a primeira sendo imediatamente após o animal entrar no tubo de restrição e a última assim que completaram 30 minutos no tubo.

4.11 - Soluções e drogas utilizadas

LCR - líquido cefalorraquidiano artificial, NaCl 100 mM; Na₃PO₄ 2 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 1,0 mM; NaHCO₃ 27 mM; CaCl₂ 2,5 mM; pH=7,4), tribromoetanol (SIGMA, EUA), uretana (SIGMA, EUA), NBQX (TOCRIS, EUA, antagonista de receptores não-NMDA de glutamato), LY235959 (TOCRIS, EUA, antagonista de receptores NMDA de glutamato), N-Propil-L-arginina (N-propil, TOCRIS, EUA, inibidor seletivo da nNOS), Carboxi-PTIO (TOCRIS, EUA, seqüestrador de NO); ODQ (inibidor específico da formação da guanilato ciclase); Pentabiótico veterinário (Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) e analgésico não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brasil).

4.12 - Determinação anatômica dos sítios de injeção de droga no Córtex Insular

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com urethana na dose de 1,2 g/kg i.p., antes do início da perfusão. Foi injetado o corante azul de Evan a 1% no local de administração da droga no CI, no mesmo volume da injeção das drogas (100 nL). Em seguida,

realizou-se a perfusão e os encéfalos foram removidos da caixa craniana, pós-fixados e posteriormente seccionados em cortes frontais de 40 μm de espessura para análise dos sítios de injeção.

4.13- Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para análise estatística foi utilizado o programa Prism 6.0 (GraphPad, USA). Foi usado o teste t Student pareado para comparar os valores basais da PA, FC, temperatura cutânea antes e após tratamento com as drogas. As alterações cardiovasculares, temperatura cutânea e corticosterona foram analisadas pelo teste de variância de dois fatores (ANOVA two-way) utilizando como variáveis os fatores do tratamento (controle ou droga) e o tempo como medida repetida. Quando os resultados mostraram-se diferentes após ANOVA two-way, foi realizado o pós teste de medidas repetidas, Bonferroni's.

PROCOLOS EXPERIMENTAIS

5 – PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

5.1 - Estudo da participação do CI nas respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea ao estresse por restrição.

5.1.1 - Efeito do tratamento do CI com LY235959, um antagonista de receptor NMDA, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição

Estes experimentos tiveram por objetivo verificar o envolvimento de receptores glutamatérgicos no CI na modulação das respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea desencadeadas pelo Estresse por restrição. Para tanto, foi utilizado o antagonista seletivo de receptores glutamatérgicos NMDA, LY235959 (1nmol/100nL) (FASSINI et al., 2015b; FERREIRA-JUNIOR et al., 2013).

5.1.2 - Efeito do tratamento do CI com NBQX, um antagonista de receptor não-NMDA, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição

Estes experimentos tiveram por objetivo verificar o envolvimento de receptores glutamatérgicos no CI na modulação das respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea desencadeadas pelo Estresse por restrição. Para tanto, foi utilizado o antagonista seletivo de receptores não-NMDA, NBQX (1nmol/100nL) (FASSINI et al., 2015b; FERREIRA-JUNIOR et al., 2013).

5.1.3 - Efeito do tratamento do CI com NPLA, um bloqueador da NOS, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição

Estes experimentos tiveram por objetivo verificar o envolvimento do sistema nitrérgico no CI na modulação das respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea desencadeadas pelo estresse por restrição. Para tanto, foi utilizado o inibidor seletivo da nNOS, N-Propil (0.4 nmol/100nL) (BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2018; FASSINI et al., 2015b; FERREIRA-JUNIOR et al., 2013);

5.1.4 - Efeito do tratamento do CI com Carboxi-PTIO, um sequestrador de NO, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição

Estes experimentos tiveram por objetivo verificar o envolvimento do sistema nitrérgico no CI na modulação das respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea desencadeadas pelo estresse por restrição. Para tanto, foi utilizado o sequestrador de NO, Carboxi-PTIO (1 nmol/100nL) (BUSNARDO et al., 2019a; FASSINI et al., 2015b; FERREIRA-JUNIOR et al., 2013).

5.1.5 - Efeito do tratamento do CI com ODQ, um inibidor da guanilato ciclase, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição

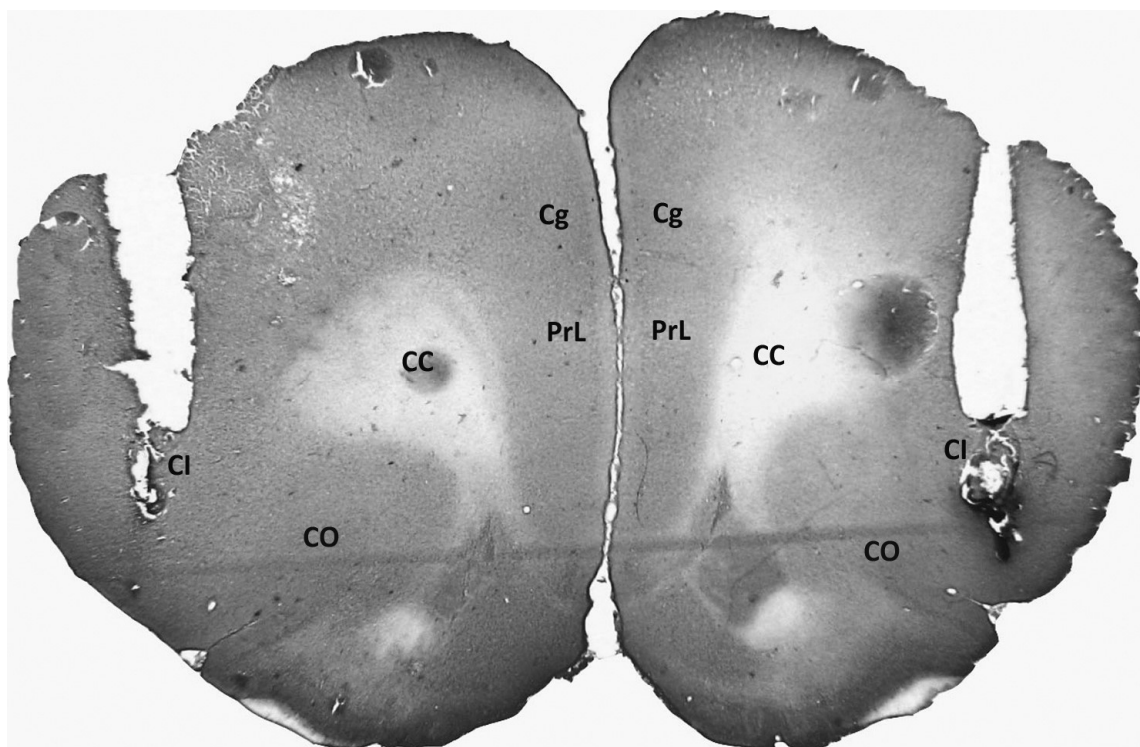
Estes experimentos tiveram por objetivo verificar o papel cascata de ativação da guanilato ciclase produzindo guanosina monofosfato ciclase (cGMP) no CI na modulação das respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea desencadeadas pelo estresse por restrição. Para tanto, foi utilizado o inibidor seletivo da guanilato ciclase ODQ (1 nmol/100nL) (BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2018; FASSINI et al., 2015b; FERREIRA-JUNIOR et al., 2013).

RESULTADOS

6 - RESULTADOS

6.1 – Determinação do sítio de injeção das drogas

Figura 5- Foto de um corte histológico, representativa de sítios de injeção no córtex insular (CI).



Legenda - Abreviações: corpo caloso (CC); córtex pré-límbico (PrL), córtex cingulado (Cg), córtex orbital (CO).

Fonte: Da Autora (2020).

6.2 – Efeito do tratamento do CI com LY235959, um antagonista de receptor NMDA, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de 46 licocorticoides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição

Figura 6 - Dispersão dos sítios de injeção de um antagonista de receptores NMDA, LY235959 (Continua).

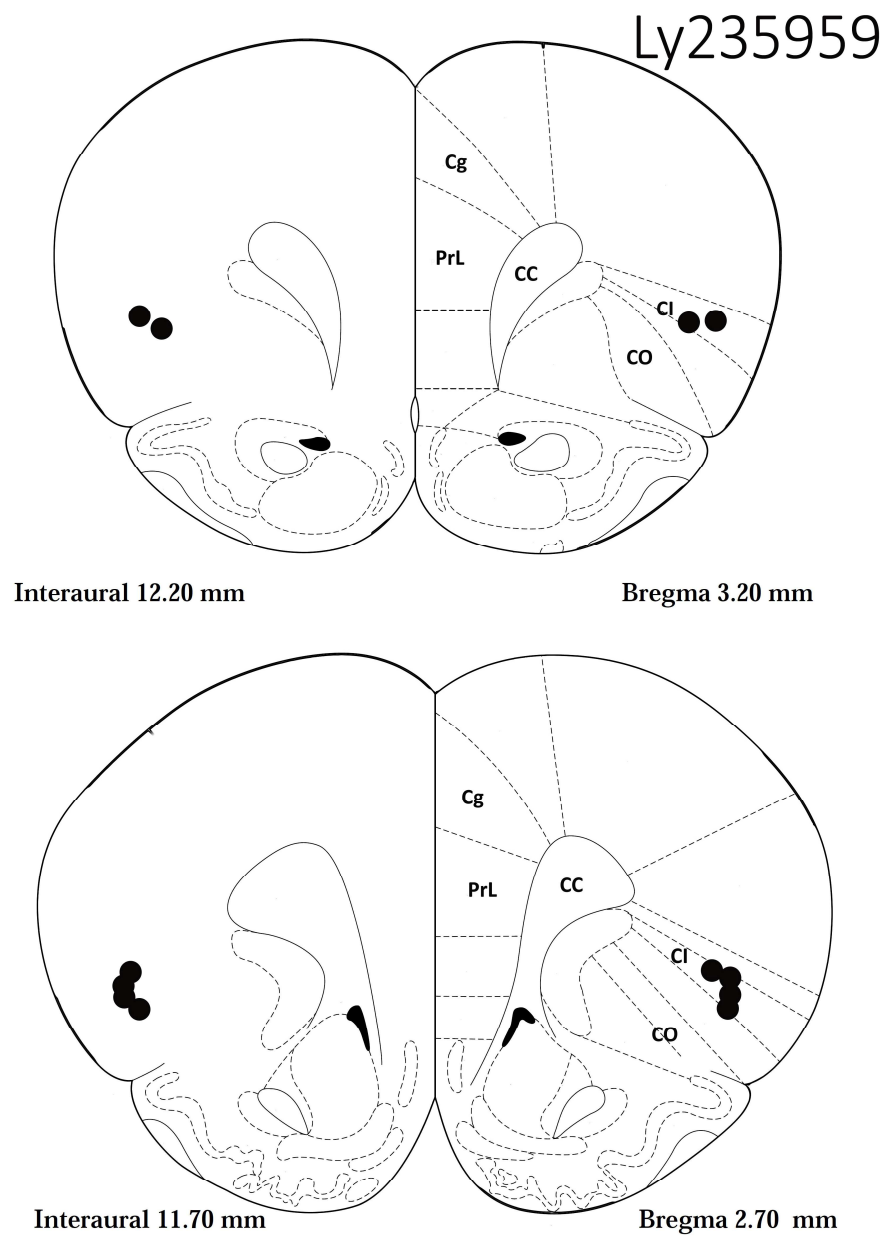
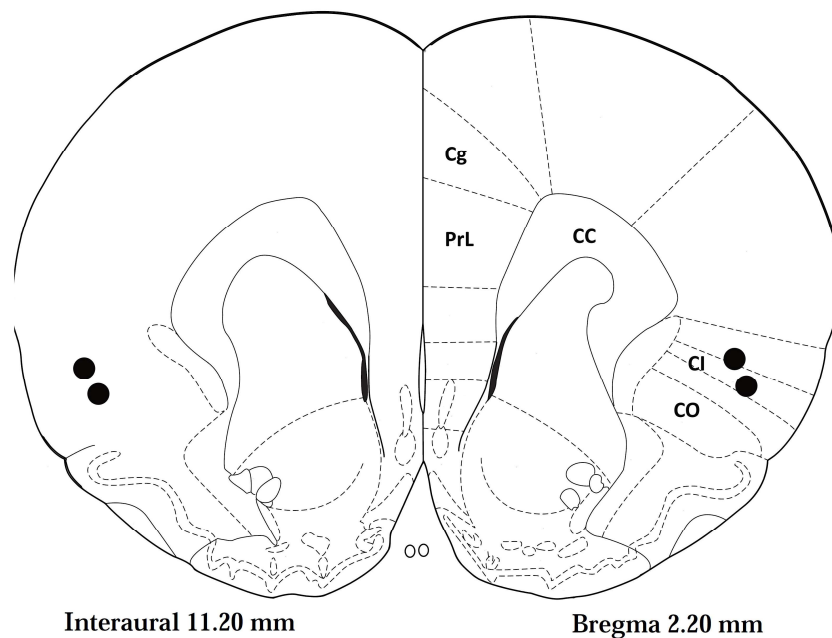


Figura 6 - Dispersão dos sítios de injeção de um antagonista de receptores NMDA, LY235959 (Conclusão).



Legenda: Dispersão dos sítios de injeção da droga LY235959 (1nmol/100nL), a partir de representação esquemática baseada no Atlas Paxinos e Watson (1997). Abreviações: corpo caloso (CC); córtex pré-límbico (PrL), córtex cingulado (Cg), córtex orbital (CO).

Fonte: Da Autora (2020).

A microinjeção de LY235959 (1nmol/100nL) no CI não alterou os valores basais da PAM, FC e temperatura caudal (TC) dos animais, conforme representado na tabela 1, $p < 0,05$.

Tabela 1- Valores basais de PAM, FC e TC em animais controle e tratados com LY235959.

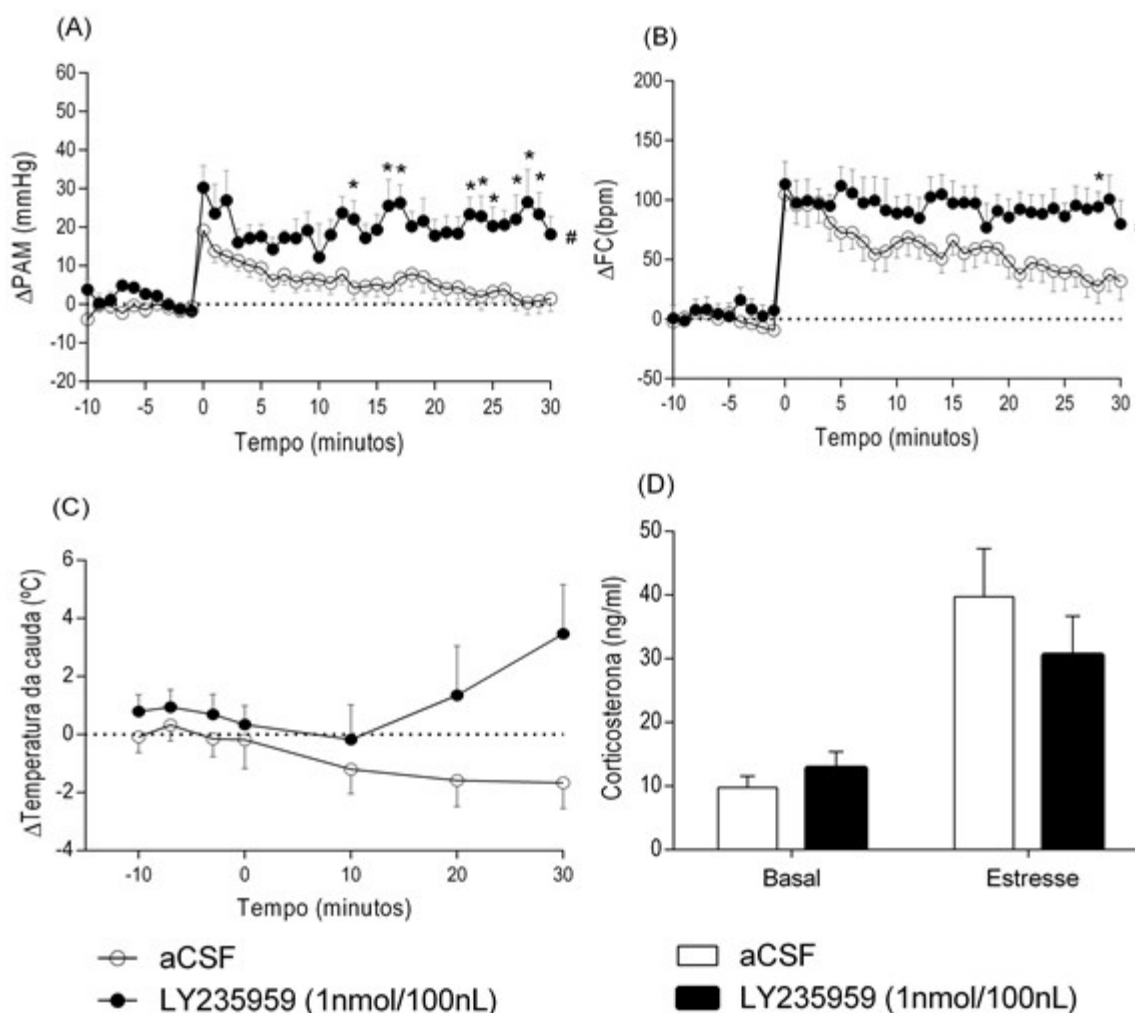
	PAM (mmHg)					FC (bpm)					TC (°C)				
	n	Antes	Após	p	t	n	Antes	Após	p	t	n	Antes	Após	p	t
aCSF	9	118,34 ± 4,90	118,24 ± 6,02	0,7	0,36	9	353,06 ± 13,34	343,67 ± 9,87	0,8	0,26	8	29,18 ± 0,93	29,35 ± 0,52	0,55	0,61
LY235959	8	128,94 ± 2,39	129,16 ± 2,65	0,8	0,2	8	370,16 ± 11,31	378,58 ± 17,58	0,11	1,81	7	30,22 ± 1,08	31,03 ± 1,13	0,23	1,33

Nota – Resultado do teste de diferença das médias (teste t student) dos valores basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura caudal (TC), antes e após injeção de LY235959. Valores expressos em média e erro padrão da média.

Fonte: Da autora (2020).

A injeção do antagonista de receptor NMDA, LY235959, potencializou a resposta pressora (tratamento: $p = 0,0021$, $F_{(1,15)} = 13,80$; tempo: $p < 0,0001$, $F_{(40,600)} = 8,899$; interação: $p < 0,0001$, $F_{(40,600)} = 2,627$) e resposta taquicárdica (tratamento: $p = 0,0451$, $F_{(1,15)} = 4,780$; tempo: $p < 0,0001$, $F_{(40,600)} = 20,45$; interação: $p = 0,0013$, $F_{(40,600)} = 1,859$) em função do tempo, mas não alterou a queda da temperatura da cauda (tratamento: $p = 0,1083$, $F_{(1,13)} = 2,974$; tempo: $p = 0,3424$, $F_{(6,78)} = 1,149$; interação: $p = 0,0077$, $F_{(6,78)} = 3,173$) e corticosterona sérica (tratamento: $p = 0,5703$, $F_{(1,11)} = 0,3423$; tempo: $p = 0,0008$, $F_{(1,11)} = 21,02$; interação: $p = 0,2652$, $F_{(1,11)} = 1,378$) nas alterações desencadeadas pelo ER.

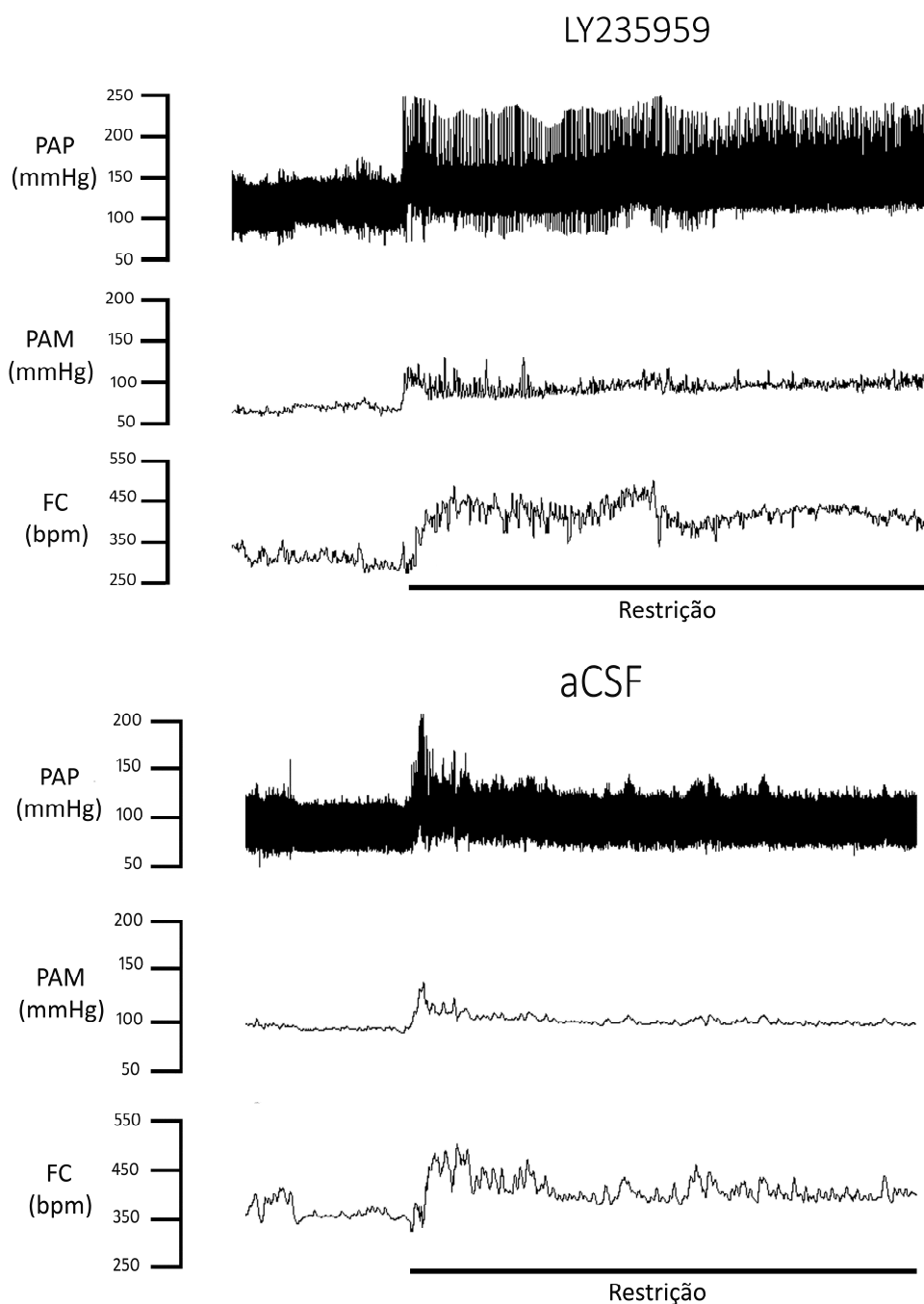
Figura 7- Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC), temperatura caudal (Δ TC) e concentração sérica de corticosterona, em animais submetidos ao estresse por restrição (ER) tratados com LY235959.



Legenda - Variação da pressão arterial média (Δ PAM) (A), frequência cardíaca (Δ FC) (B), temperatura caudal (Δ TC) (C) ao longo do tempo e concentração sérica de corticosterona (D), em animais submetidos ao estresse por restrição (ER) tratados com LY235959 (círculos pretos, barras pretas), um antagonista de receptores NMDA, na dose de 1nmol/100nL ou tratados com líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF) (círculos brancos, barras brancas). No tempo 0 os animais foram submetidos ao estresse por restrição. Os círculos e barras (corticosterona) representam os valores médios \pm EPM. * indica o tempo onde grupo LY235959 apresentou diferença comparado ao grupo aCSF, pelo pós teste de múltiplas comparações Bonferroni's. # indica diferença no tratamento.

Fonte: Da autora (2020).

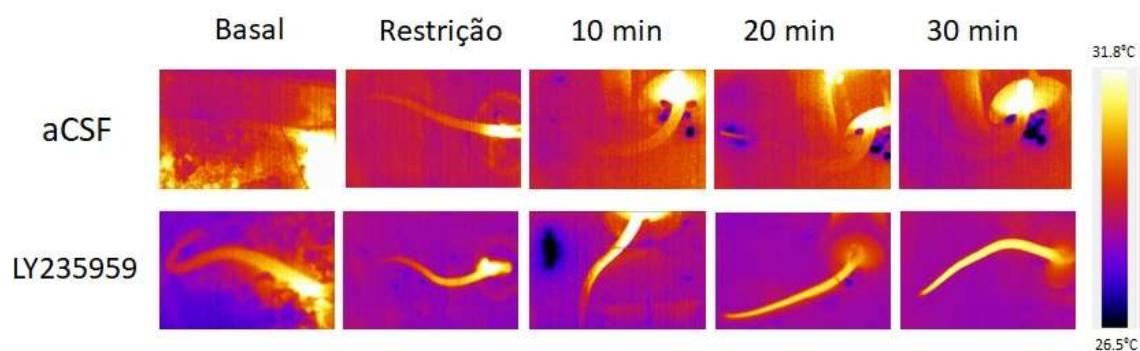
Figura 8 - Registro representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição, tratados com LY235959.



Legenda - Registro representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição, tratados com LY235959, um antagonista de receptores NMDA, na dose de 1nmol/100nL ou líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF).

Fonte: Da autora (2020).

Figura 9 - Representação termográfica da variação da temperatura caudal de animais tratados com LY235959.



Legenda: Representação termográfica da variação da temperatura caudal ao longo do tempo de experimento, de animais tratados com LY235959 (1nmol/100nL) e com líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF – 100nL), submetidos ao estresse por restrição.

Fonte: Da autora (2020).

6.3 - Efeito do tratamento do CI com NBQX, um antagonista de receptor não-NMDA, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição

Figura 10 - Dispersão dos sítios de injeção de um antagonista de receptores não NMDA, NBQX (Continua).

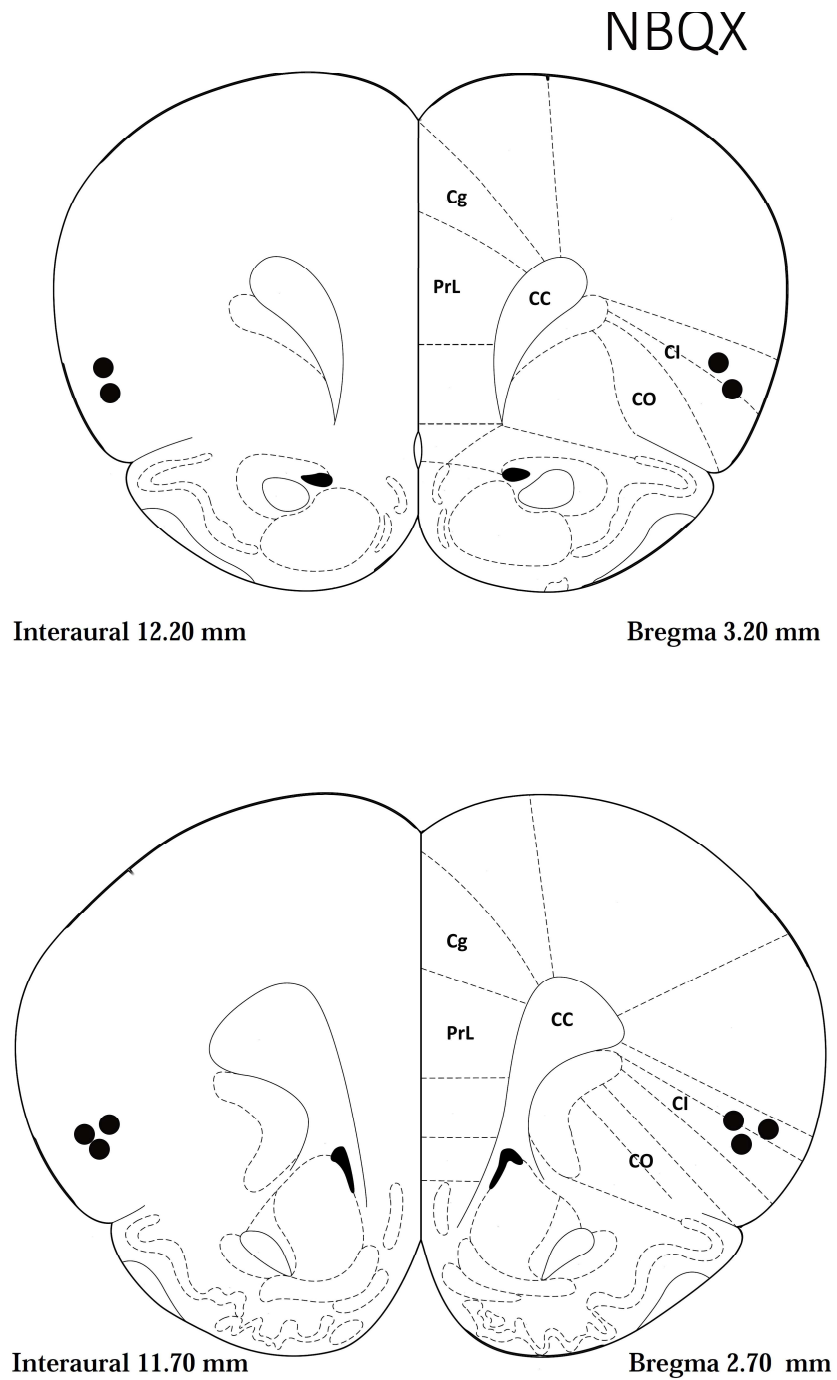
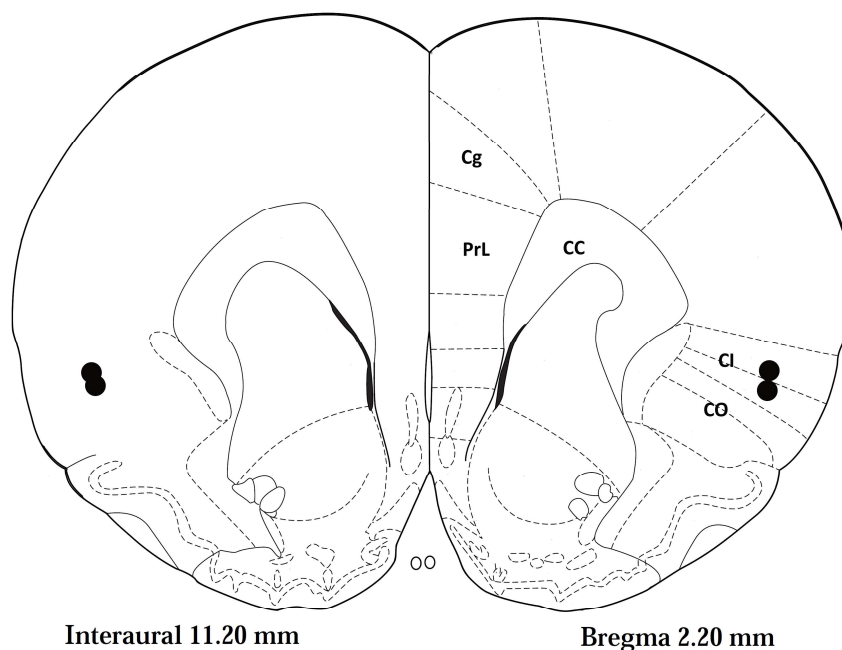


Figura 10 - Dispersão dos sítios de injeção de um antagonista de receptores não NMDA, NBQX (Conclusão).



Legenda: Dispersão dos sítios de injeção da droga NBQX (1nmol/100nL), a partir de representação esquemática baseada no Atlas Paxinos e Watson (1997). Abreviações: corpo caloso (CC); córtex pré-límbico (PrL), córtex cíngulado (Cg), córtex orbital (CO).

Fonte: Da Autora (2020).

A microinjeção de NBQX (1nmol/100nL), no CI não alterou os valores basais da PAM, FC e TC dos animais, conforme apresentado na tabela 2, $p < 0,05$.

Tabela 2 - Valores basais de PAM, FC e TC em animais controle e tratados com NBQX.

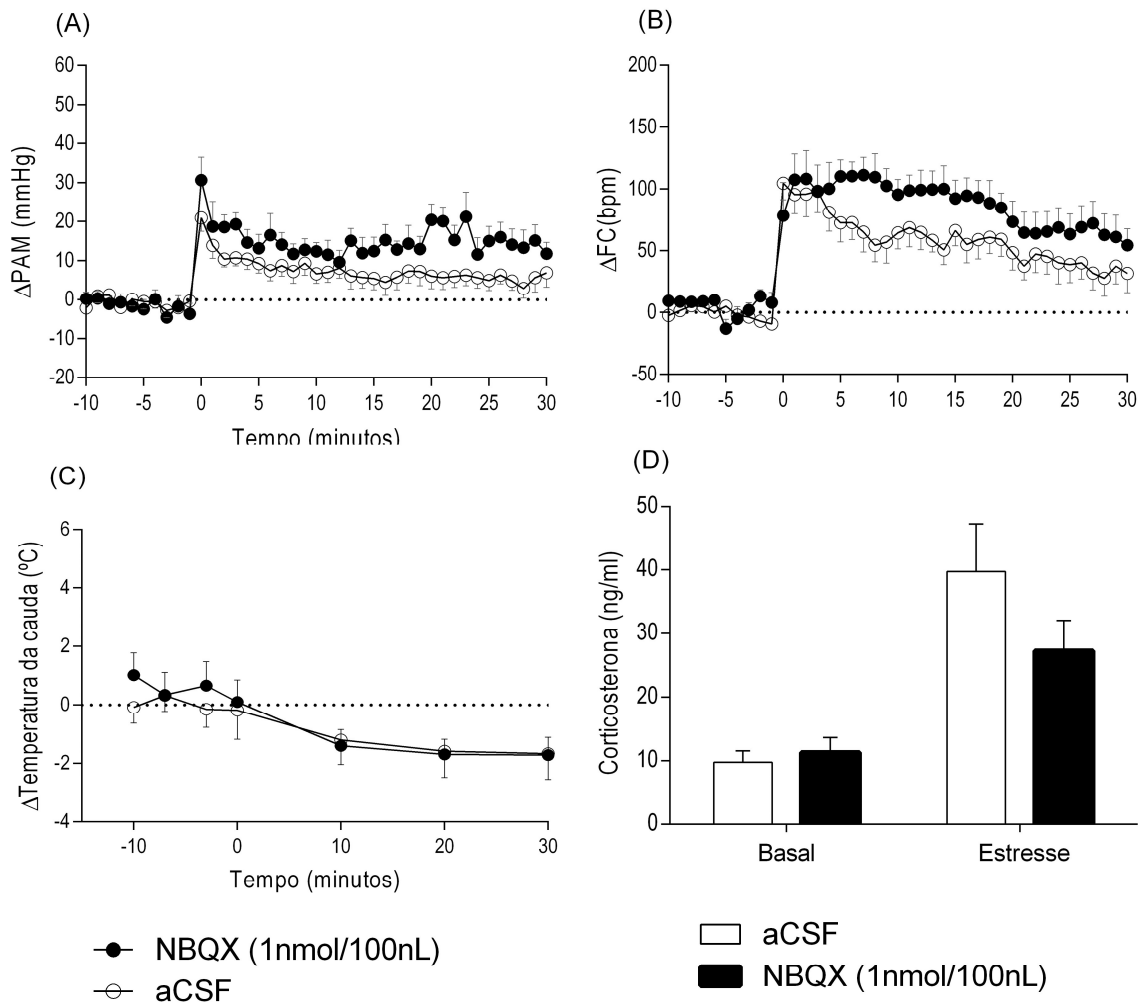
	PAM (mmHg)					FC (bpm)					TC (°C)				
	N	Antes	Após	p	t	n	Antes	Após	p	t	N	Antes	Após	P	t
aCSF	9	118,34 ± 4,90	118,24 ± 6,02	0,7	0,36	9	353,06 ± 13,34	343,67 ± 9,87	0,8	0,26	8	29,18 ± 0,93	29,35 ± 0,52	0,55	0,61
NBQX	7	118,43 ± 3,46	116,15 ± 2,64	0,4	0,98	7	341,79 ± 13,33	348,08 ± 10,41	0,13	1,74	8	29,85 ± 0,61	30,55 ± 0,61	0,39	0,91

Nota - Resultado do teste de diferença das médias (teste t student) comparando valores basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura caudal (TC), antes e após injeção de NBQX. Valores expressos em média e erro padrão da média.

Fonte: Da Autora (2020).

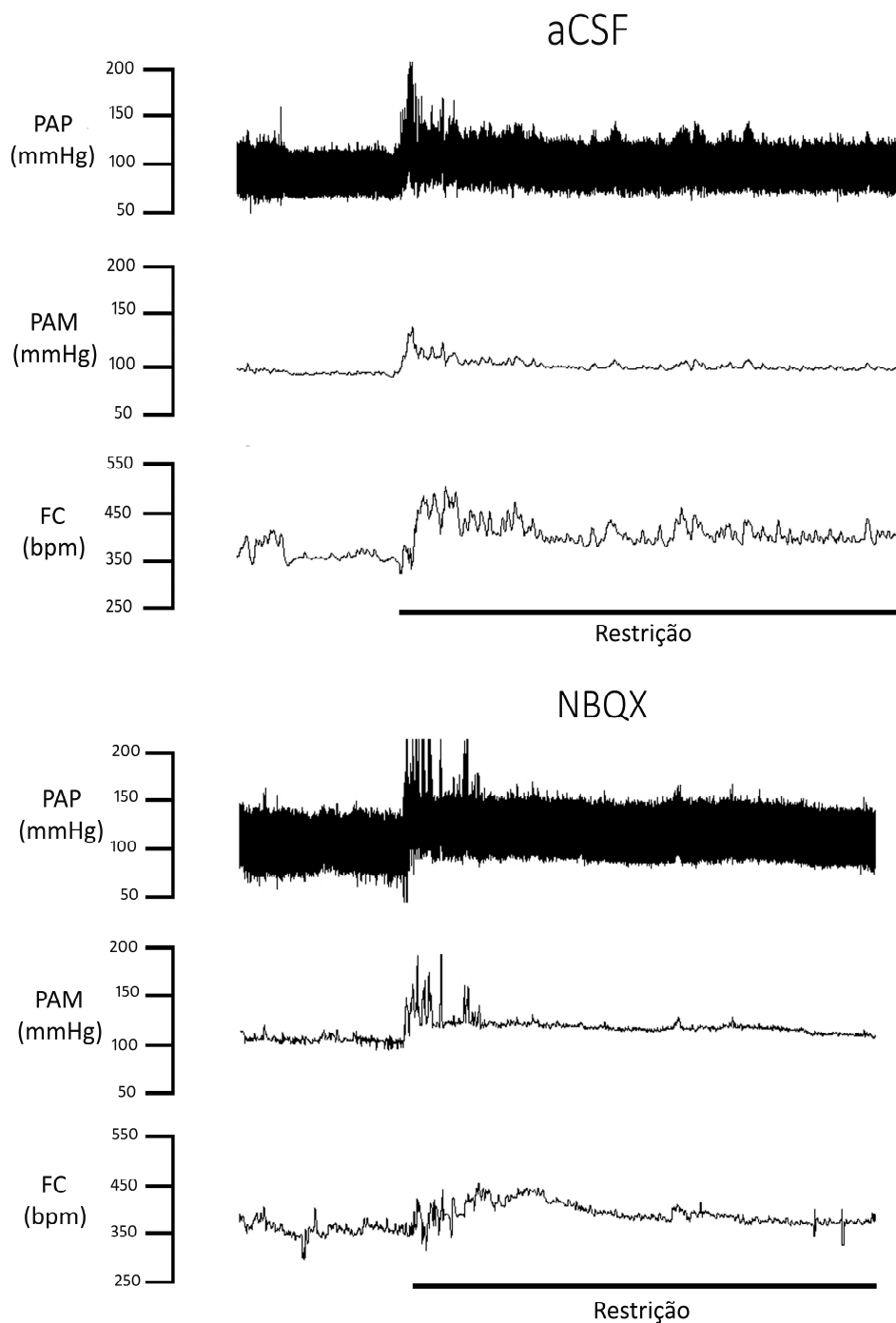
A injeção de NBQX, um antagonista de receptor não-NMDA no CI não alterou a PAM (tratamento: $p = 0,0843$, $F_{(1,14)} = 3,453$; tempo: $p < 0,0001$, $F_{(40,560)} = 15,49$; interação: $p < 0,0001$, $F_{(40,560)} = 2,247$), FC (tratamento: $p = 0,104$, $F_{(1,14)} = 3,023$; tempo: $p < 0,0001$, $F_{(40,560)} = 21,80$; interação: $p = 0,068$, $F_{(40,560)} = 1,369$), temperatura da cauda (tratamento: $p = 0,7794$, $F_{(1,14)} = 0,08151$; tempo: $p < 0,0001$, $F_{(6,84)} = 14,95$; interação: $p = 0,4435$, $F_{(6,84)} = 0,9808$), e também não alterou a corticosterona sérica (tratamento: $p = 0,2491$, $F_{(1,11)} = 1,481$; tempo: $p = 0,0004$, $F_{(1,11)} = 24,67$; interação: $p = 0,1572$, $F_{(1,11)} = 2,305$) nos animais submetidos ao ER.

Figura 11 - Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC), temperatura caudal (Δ TC) e concentração sérica de corticosterona (D), em animais submetidos ao estresse por restrição (ER) e tratados com NBQX.



Legenda - Variação da pressão arterial média (Δ PAM) (A), frequência cardíaca (Δ FC) (B), temperatura caudal (Δ TC) (C) ao longo do tempo e concentração sérica de corticosterona (D), em animais submetidos ao estresse por restrição (ER) tratados com NBQX (círculos pretos, barras pretas), um antagonista de receptores não-NMDA, na dose de 1nmol/100nL, ou tratados com líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF) (círculos brancos, barras brancas). No tempo 0 os animais foram submetidos ao estresse por restrição. Os círculos e barras (corticosterona) representam os valores médios \pm EPM. * indica o tempo onde grupo NBQX apresentou diferença comparado ao grupo aCSF, pelo pós teste de múltiplas comparações Bonferroni's. # indica diferença no tratamento.

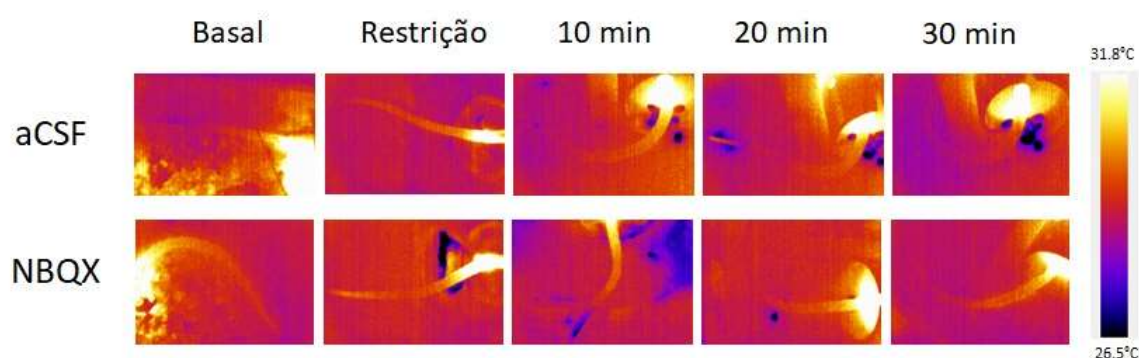
Figura 12 - Representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição e tratados com NBQX.



Legenda - Representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição. Tratados com NBQX um antagonista de receptores não NMDA, na dose de 1nmol/100nL ou líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF).

Fonte: Da Autora (2020).

Figura 13 - Representação termográfica da variação da temperatura caudal de animais tratados com NBQX.



Legenda - Representação termográfica da variação da temperatura caudal ao longo do tempo de experimento, de animais tratados com NBQX (0,4nmol/100nL) e com líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF – 100nL), submetidos ao estresse por restrição

6.4 - Efeito do tratamento do CI com NPLA, um bloqueador da NOS, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição

Figura 14 -Dispersão dos sítios de injeção de um bloqueador da óxido nítrico sintase (NOS), NPLA (Continua).

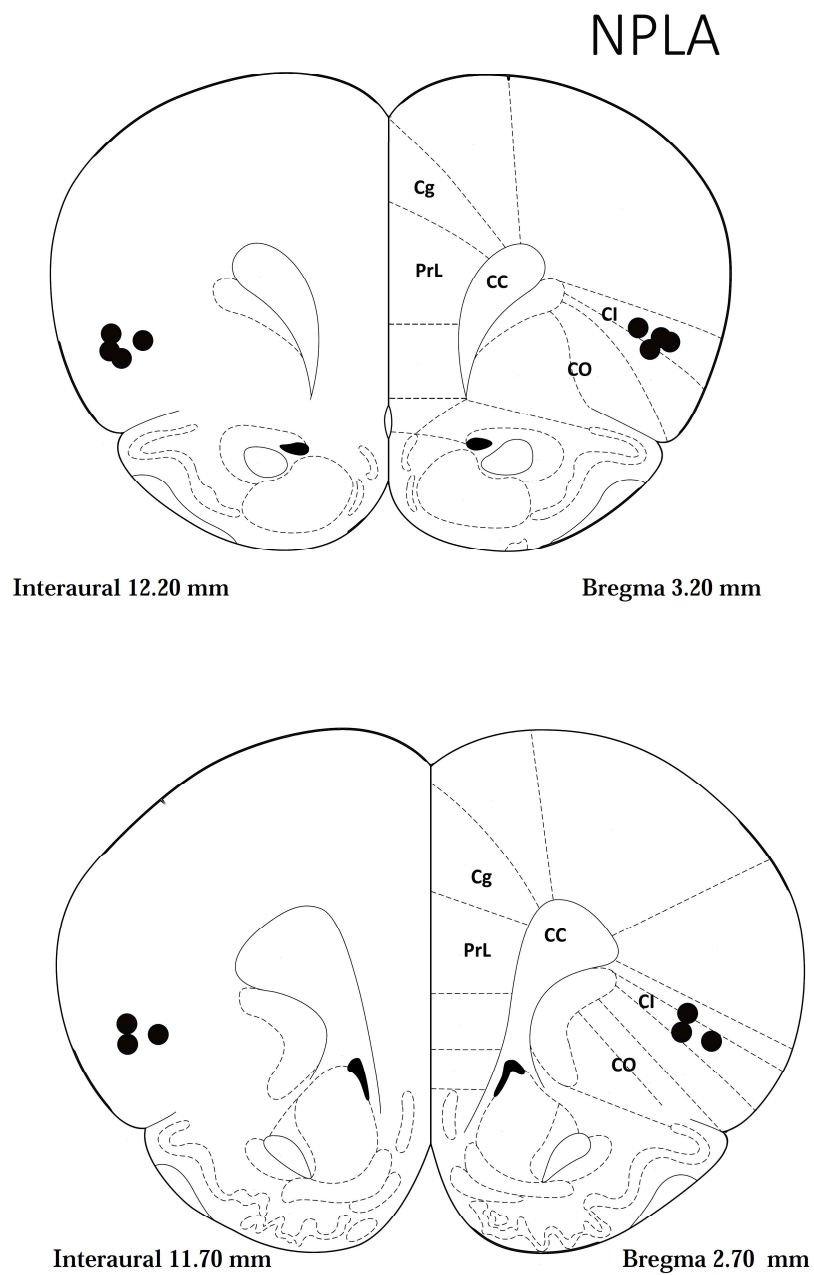
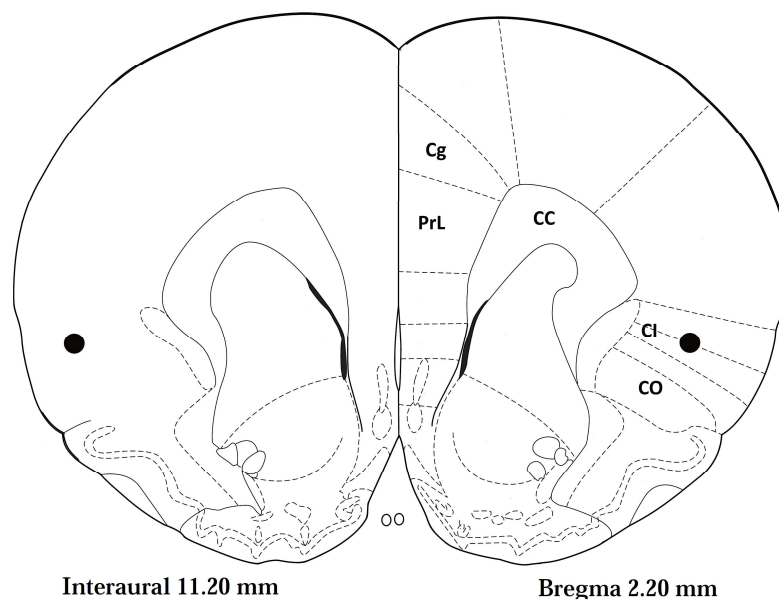


Figura 14: Dispersão dos sítios de injeção de um bloqueador da óxido nítrico sintase (NOS), NPLA (Conclusão).



Legenda - Dispersão dos sítios de injeção de um bloqueador da óxido nítrico sintase (NOS), NPLA (0,4 nmol/100nL), a partir de representação esquemática baseada no Atlas Paxinos e Watson (1997). Abreviações: corpo caloso (CC); córtex pré-límbico (PrL), córtex cingulado (Cg), córtex orbital (CO).

Fonte: Da Autora (2020).

A microinjeção de NPLA (0,4nmol/100nL), no CI não alterou os valores basais da PAM, FC e TC dos animais, conforme representado na tabela 3, $p < 0,05$.

Tabela 3 - Valores basais de PAM, FC e TC em animais controle e tratados com NPLA.

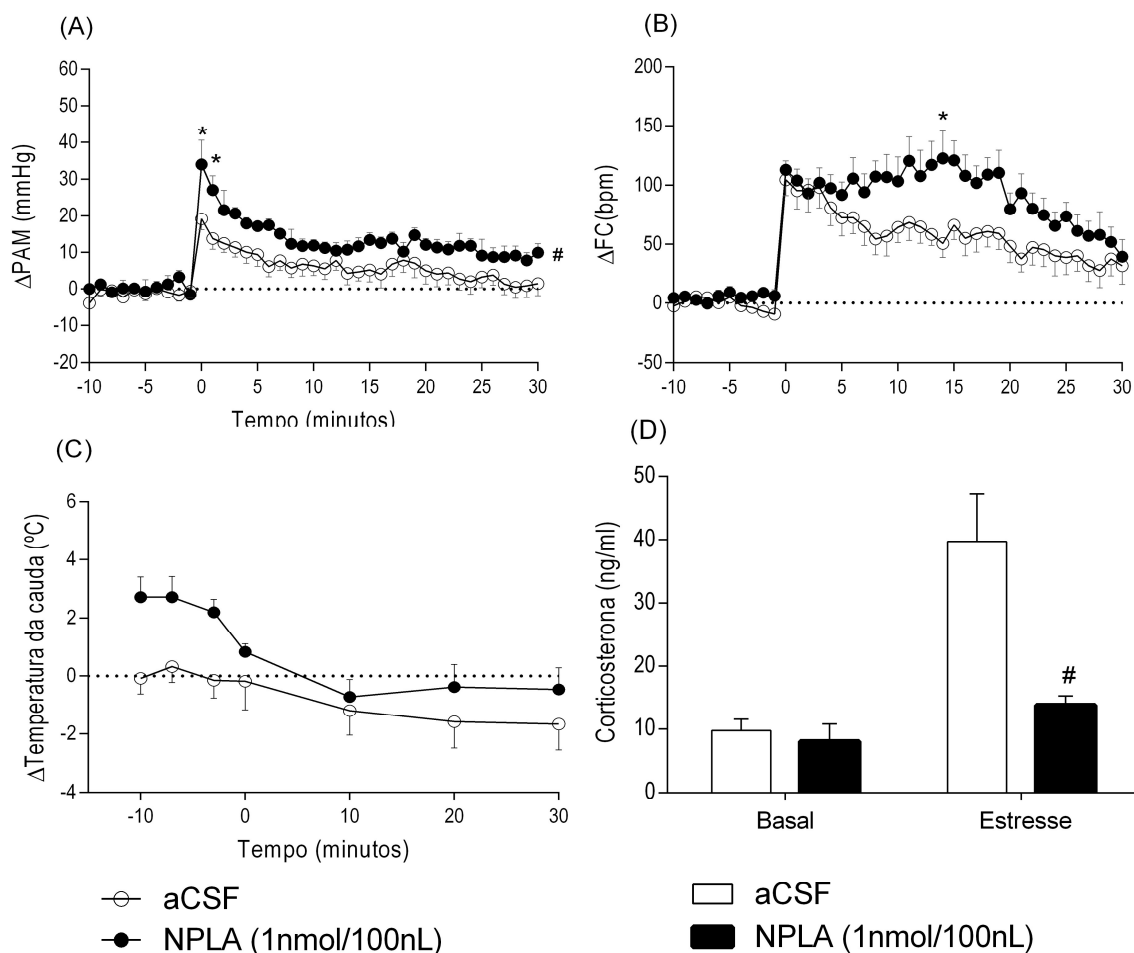
	PAM (mmHg)					FC (bpm)					TC (°C)				
	N	Antes	Após	p	t	n	Antes	Após	p	T	n	Antes	Após	p	t
aCSF	9	118,34 ± 4,90	118,24 ± 6,02	0,7	0,36	9	353,06 ± 13,34	343,67 ± 9,87	0,8	0,26	8	29,18 ± 0,93	29,35 ± 0,52	0,55	0,61
NPLA	8	106,43 ± 3,73	107,97 ± 4,02	0,3	1,14	8	366,93 ± 12,55	368,08 ± 10,39	0,79	0,27	5	28,92 ± 0,66	31,48 ± 1,19	0,08	2,32

Nota - Resultado do teste de diferença das médias (teste t student) comparando valores basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura da cauda (TC), antes e após injeção de NPLA. Valores expressos em média e erro padrão da média.

Fonte: Da Autora (2020).

A injeção do bloqueador da óxido nítrico sintase, NPLA, no CI aumentou a PAM (tratamento: $p = 0,0216$, $F_{(1,15)} = 6,569$; tempo: $p < 0,0001$, $F_{(40,600)} = 16,0$; interação: $p = 0,0779$, $F_{(40,600)} = 1,349$), FC (tratamento: $p = 0,0388$, $F_{(1,15)} = 5,125$; tempo: $p < 0,0001$, $F_{(40,600)} = 24,29$; interação: $p = 0,0007$, $F_{(40,600)} = 1,925$), mas não alterou a temperatura da cauda dos animais (tratamento: $p = 0,1053$, $F_{(1,11)} = 3,116$; tempo: $p < 0,0001$, $F_{(6,66)} = 12,18$; interação: $p = 0,1317$, $F_{(6,66)} = 1,713$). Porém, a concentração de corticosterona sérica diminuiu nos animais que receberam a injeção de NPLA (tratamento: $p = 0,0070$, $F_{(1,8)} = 12,97$; tempo: $p = 0,0041$, $F_{(1,8)} = 15,83$; interação: $p = 0,0273$, $F_{(1,8)} = 7,267$) após o ER.

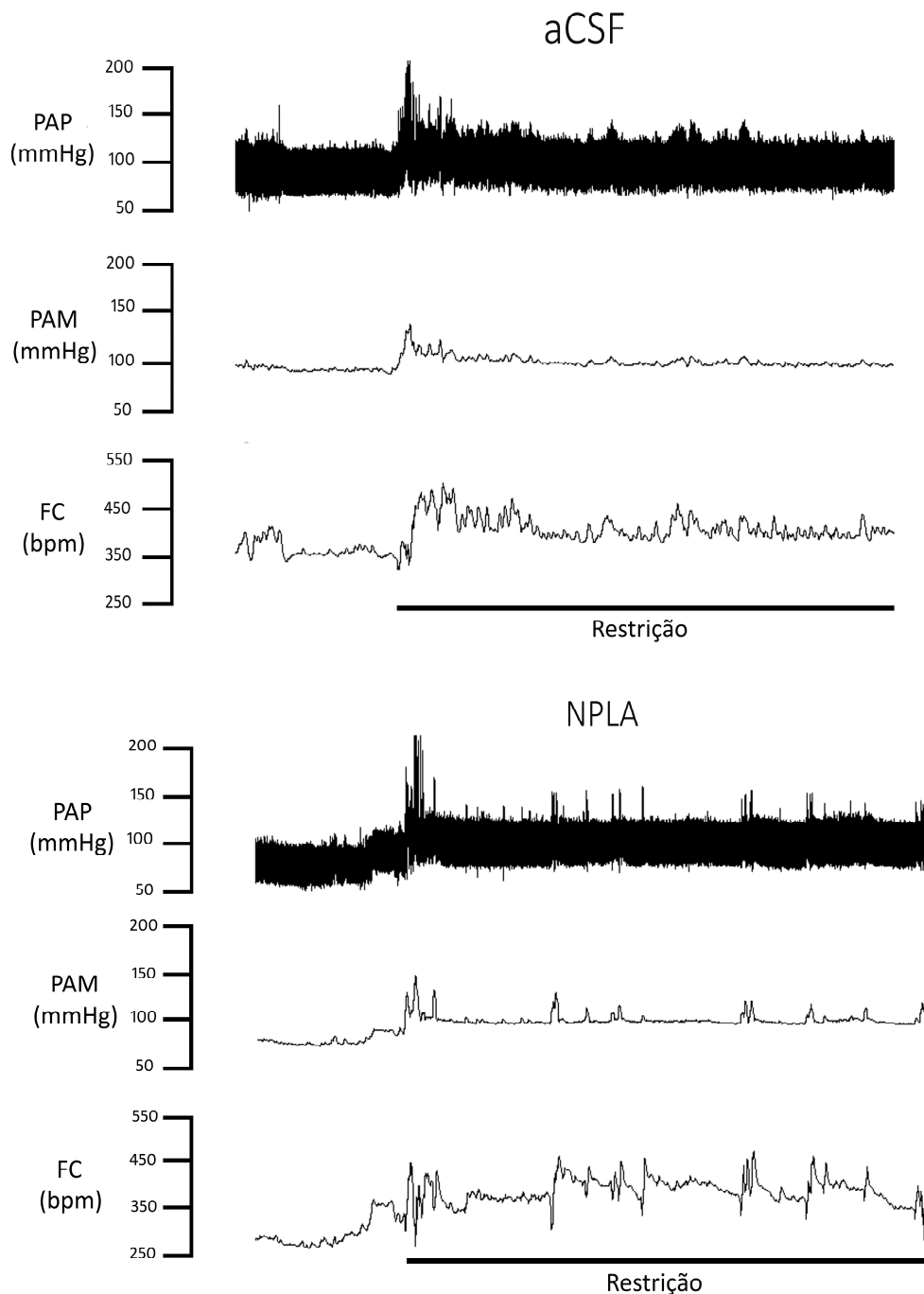
Figura 15: Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura caudal (Δ TC) e concentração sérica de corticosterona, em animais submetidos ao estresse por restrição (ER) e tratados com NPLA



Legenda - Variação da pressão arterial média (Δ PAM) (A), frequência cardíaca (Δ FC) (B) e temperatura caudal (Δ TC) (C) ao longo do tempo e concentração sérica de corticosterona (D), em animais submetidos ao estresse por restrição (ER) e tratados com NPLA (círculos pretos, barras pretas), um bloqueador da óxido nítrico sintase, na dose de 0,4nmol/100nL, ou tratados com líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF) (círculos brancos, barras brancas). No tempo 0 os animais foram submetidos ao estresse por restrição. Os círculos e barras (corticosterona) representam os valores médios \pm EPM. * indica o tempo onde grupo NPLA apresentou diferença comparado ao grupo aCSF, pelo pós teste de múltiplas comparações Bonferroni's. # indica diferença no tratamento

Fonte: Da Autora (2020).

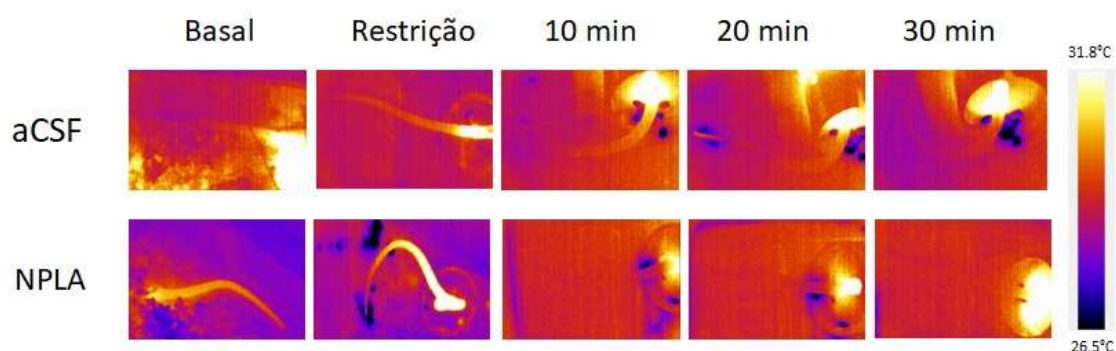
Figura 16 - Representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição e tratados com NPLA.



Legenda - Representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição. Tratados com NPLA, um bloqueador da óxido nítrico sintase na dose de 0,4nmol/100nL ou líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF).

Fonte: Da Autora (2020).

Figura 17: Representação termográfica da variação da temperatura caudal de animais tratados com NPLA.

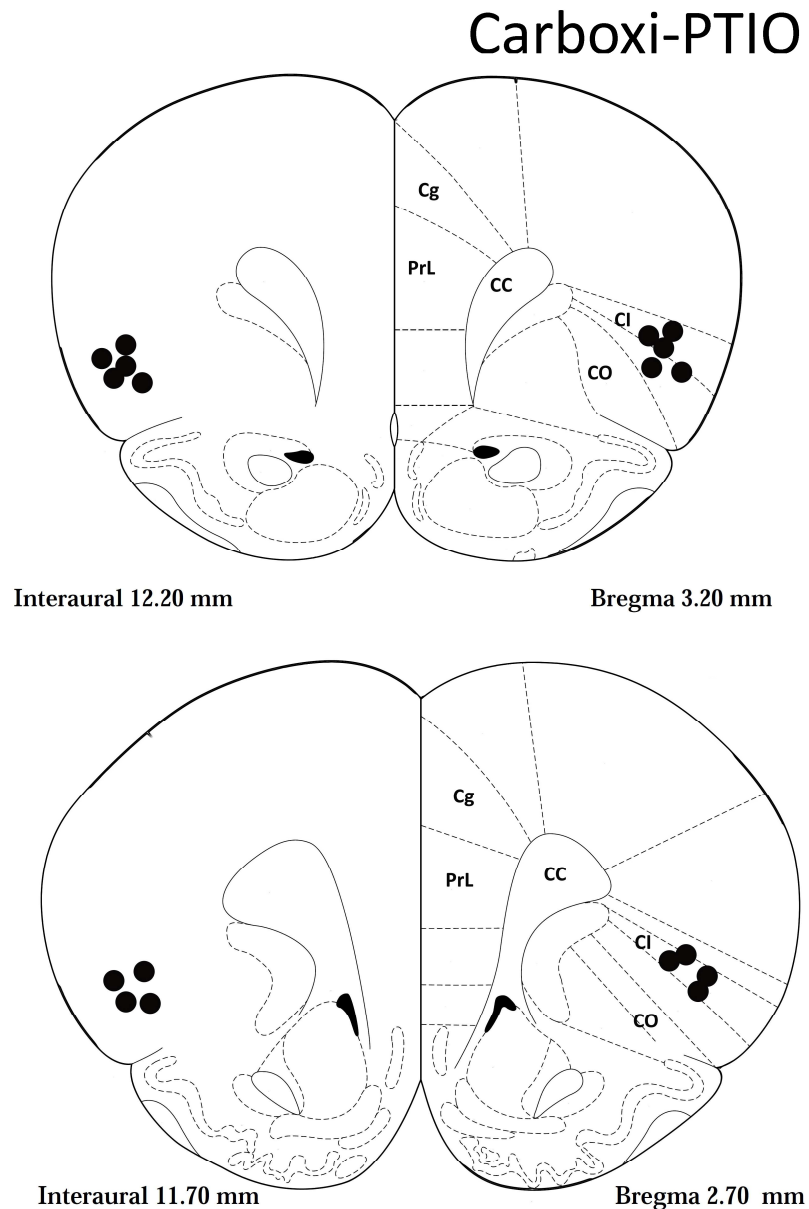


Legenda - Representação termográfica da variação da temperatura caudal ao longo do tempo de experimento, de animais tratados com NPLA (0,4nmol/100nL) e com líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF – 100nL), submetidos ao estresse por restrição.

Fonte: Da Autora (2020).

6.5 - Efeito do tratamento do CI com Carboxi-PTIO, um sequestrador de NO, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição

Figura 18: Dispersão dos sítios de injeção de um sequestrador de óxido nítrico, Carboxi-PTIO.



Legenda - Dispersão dos sítios de injeção de um sequestrador de óxido nítrico, Carboxi-PTIO (1 nmol/100nL), a partir de representação esquemática baseada no Atlas Paxinos e Watson (1997). Abreviações: corpo caloso (CC); córtex pré-límbico (PrL), córtex cingulado (Cg), córtex orbital (CO).

Fonte: Da Autora (2020).

A microinjeção de Carboxi-PTIO (1nmol/100nL), no CI não os alterou valores basais da PAM, FC e TC dos animais, conforme representado na tabela 4, $p < 0,05$.

Tabela 4: Valores basais de PAM, FC e TC em animais controle e tratados com Carboxi-PTIO.

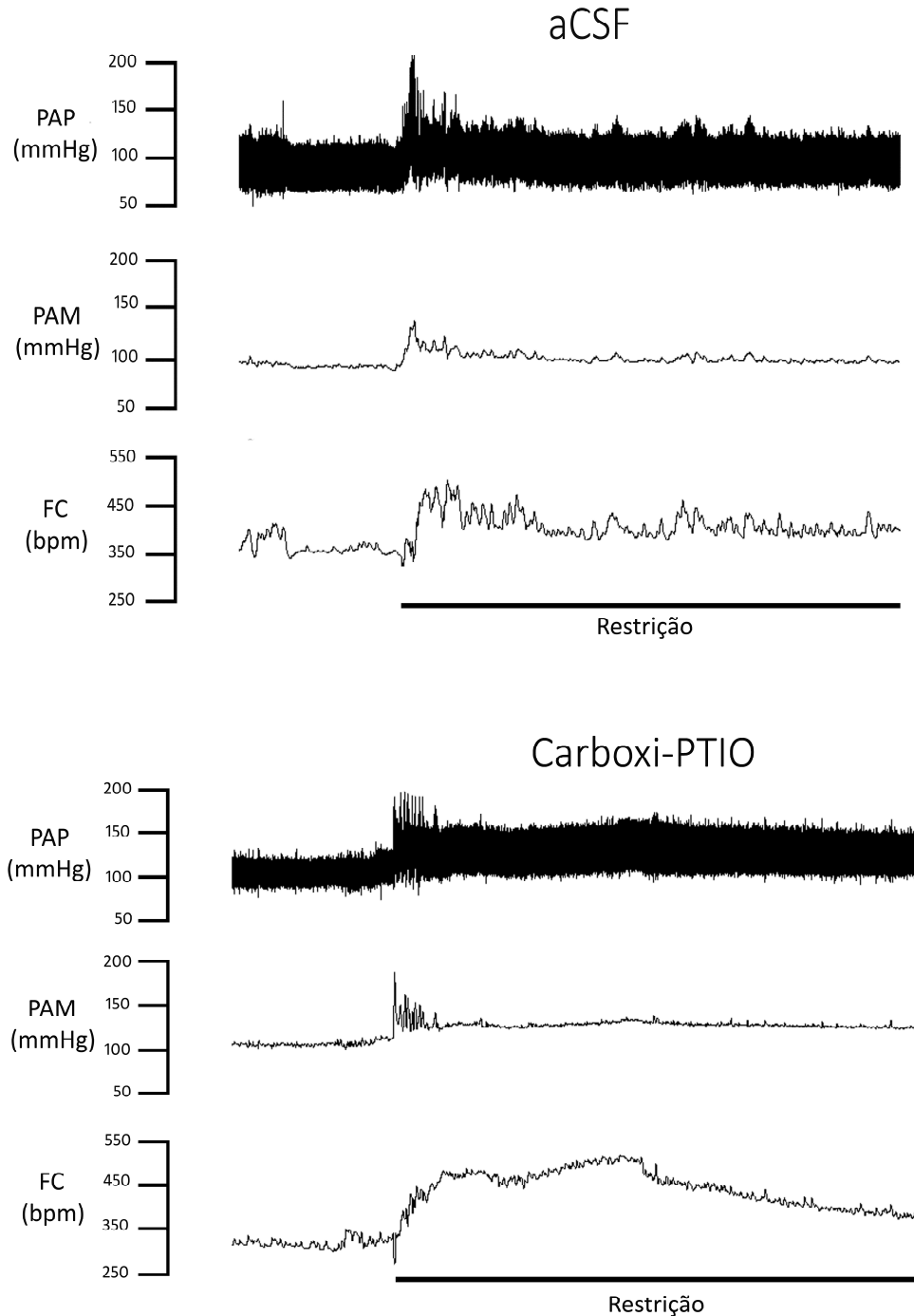
	PAM (mmHg)					FC (bpm)					TC (°C)				
	n	Antes	Após	p	t	n	Antes	Após	p	T	n	Antes	Após ±	P	t
aCSF	9	118,34 ± 4,90	118,24 ± 6,02	0,7	0,36	9	353,06 ± 13,34	343,67 ± 9,87	0,8	0,26	8	29,18 ± 0,93	29,35 ± 0,52	0,55	0,61
Carboxi-PTIO	8	110,20 ± 4,52	116,29 ± 5,79	0,1	1,88	8	346,79 ± 7,67	363,90 ± 8,47	0,11	1,83	5	29,68 ± 0,74	29,77 ± 0,81	0,92	0,11

Nota - Resultado do teste de diferença das médias (teste t student) comparando valores basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura caudal (TC), antes e após injeção de Carboxi-PTIO. Valores expressos em média e erro padrão da média

Fonte: Da Autora (2020).

A injeção do sequestrador de NO, Carboxi-PTIO, aumentou a resposta pressora em função do tempo (tratamento: $p = 0,0029$, $F_{(1,15)} = 12,59$; tempo: $p < 0,0001$, $F_{(40,600)} = 17,15$; interação: $p < 0,0001$, $F_{(40,600)} = 2,148$) e a resposta taquicárdica (tratamento: $p = 0,0372$, $F_{(1,15)} = 5,226$; tempo: $p < 0,0001$, $F_{(40,600)} = 21,65$; interação: $p = 0,5354$, $F_{(40,600)} = 0,9643$), desencadeados pelo ER. A temperatura da cauda dos animais são sofreu alterações após a microinjeção da droga (tratamento: $p = 0,6949$, $F_{(1,11)} = 0,1621$, tempo: $p < 0,0001$, $F_{(6,66)} = 6,736$; interação: $p = 0,6795$, $F_{(6,66)} = 0,6632$). Entretanto, a concentração de corticosterona sérica diminuiu (tratamento: $p = 0,0057$, $F_{(1,8)} = 13,97$; tempo: $p = 0,0029$, $F_{(1,8)} = 17,94$; interação: $p = 0,0628$, $F_{(1,8)} = 4,665$) após o ER.

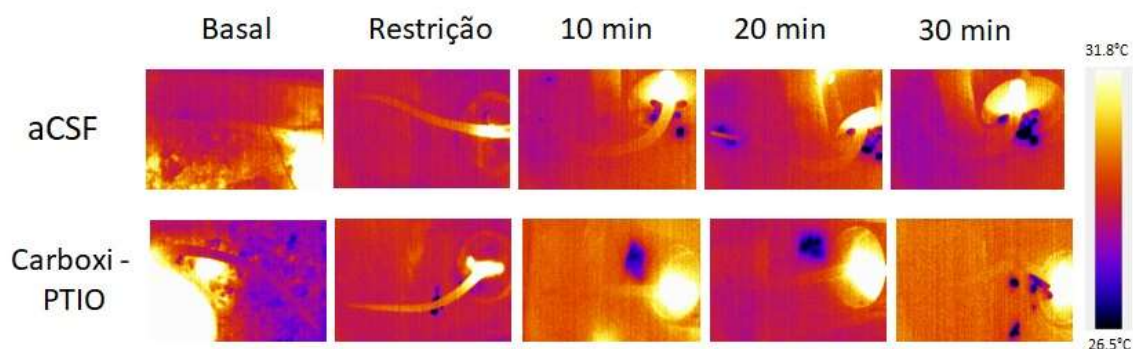
Figura 20- Representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição e tratados com Carboxi-PTIO.



Legendas - Representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição. Tratados com Carboxi-PTIO, um sequestrador de óxido nítrico, na dose de 1nmol/100nL ou líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF).

Fonte: Da Autora (2020).

Figura 21- Representação termográfica da variação da temperatura caudal de animais tratados com Carboxi-PTIO.

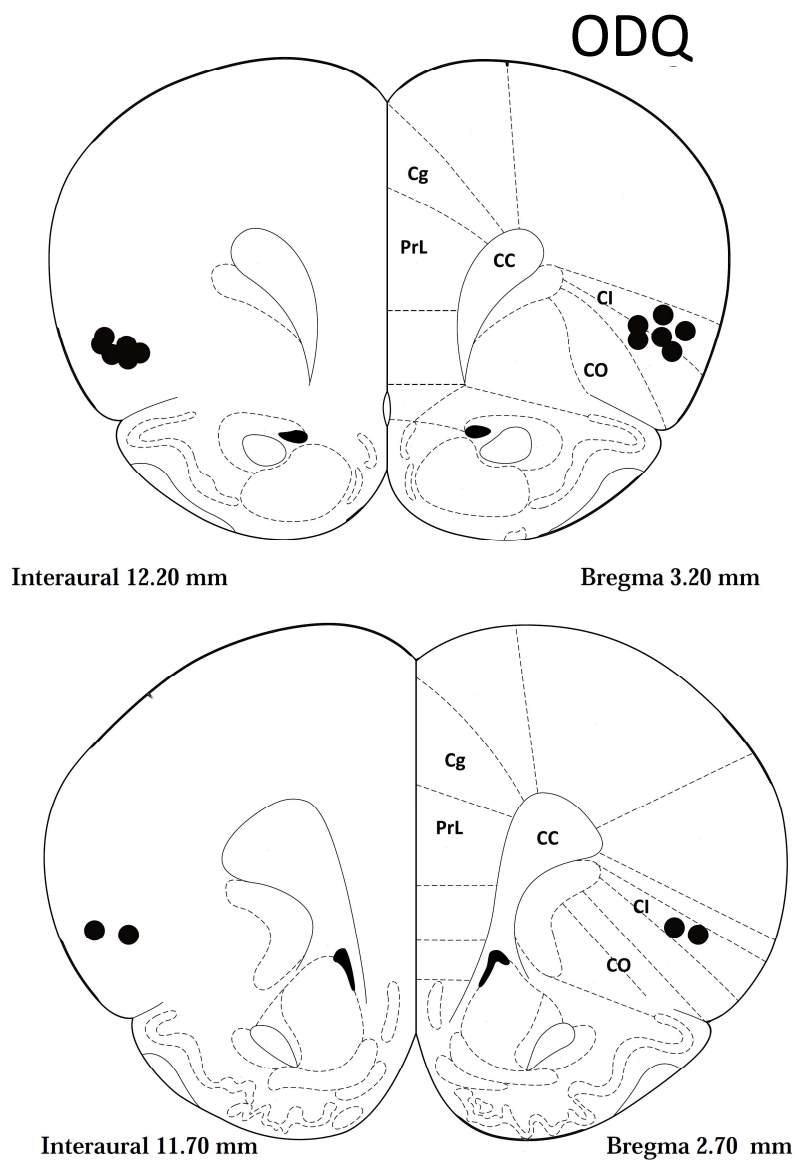


Legenda - Representação termográfica da variação da temperatura caudal ao longo do tempo de experimento, de animais tratados com Carboxi-PTIO e com líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF – 100nL), submetidos ao estresse por restrição.

Fonte: Da Autora (2020).

6.6 - Efeito do tratamento do CI com ODQ, um inibidor da guanilato ciclase, sobre as respostas cardiovasculares, liberação de glicocorticóides e temperatura cutânea durante o estresse por restrição

Figura 22 - Dispersão dos sítios de injeção de um inibidor da guanilato ciclase, ODQ.



Legenda - Dispersão dos sítios de injeção de um inibidor da guanilato ciclase, ODQ (1 nmol/100nL), a partir de representação esquemática baseada no Atlas Paxinos e Watson (1997). Abreviações: corpo caloso (CC); córtex pré-límbico (PrL), córtex cingulado (Cg), córtex orbital (CO).

Fonte: Da Autora (2020).

A microinjeção de ODQ (1nmol/100nL), no CI não alterou os valores basais da PAM, FC e TC dos animais, conforme representado na tabela 5, $p < 0,05$.

Tabela 5: Valores basais de PAM, FC e TC em animais controle e tratados com ODQ.

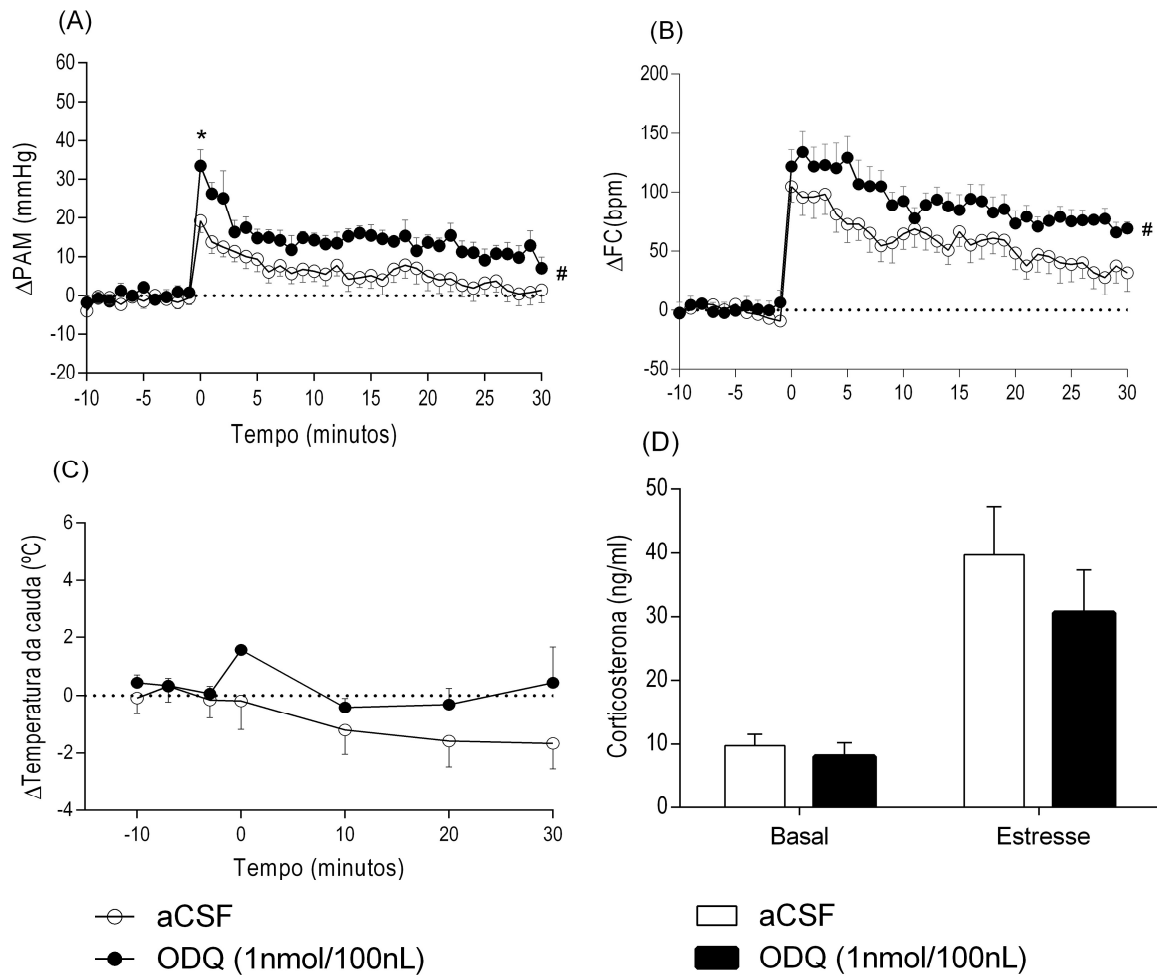
	PAM (mmHg)					FC (bpm)					TC (°C)				
	n	Antes	Após	p	t	n	Antes	Após	p	t	n	Antes	Após	p	t
aCSF	9	118,34 ± 4,90	118,24 ± 6,02	0,7	0,36	9	353,06 ± 13,34	343,67 ± 9,87	0,8	0,26	8	29,18 ± 0,93	29,35 ± 0,52	0,55	0,61
ODQ	8	111,31 ± 6,96	112,18 ± 6,91	0,8	0,2	8	350,62 ± 8,62	349,81 ± 7,70	0,59	0,56	5	28,77 ± 0,72	29,06 ± 0,93	0,26	1,31

Nota - Resultado do teste de diferença das médias (teste t student) comparando valores basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura caudal (TC), antes e após injeção de ODQ. Valores expressos em média e erro padrão da média.

Fonte: Da Autora (2020).

A injeção do inibidor da guanilato ciclase, ODQ, aumentou a PAM (tratamento: $p = 0,0205$, $F_{(1, 15)} = 6,704$; tempo: $p < 0,0001$, $F_{(40, 600)} = 17,57$; interação: $p = 0,0025$, $F_{(40, 600)} = 1,787$) e FC (tratamento: $p = 0,0426$, $F_{(1, 15)} = 4,908$; tempo: $p < 0,0001$, $F_{(40, 600)} = 29,78$; interação: $p = 0,0299$, $F_{(40, 600)} = 1,486$) em função do tempo, nos animais submetidos ao ER. A temperatura da cauda não sofreu alterações pela injeção de ODQ (tratamento: $p = 0,3219$, $F_{(1, 11)} = 1,076$; tempo: $p = 0,0018$, $F_{(6, 66)} = 4,001$; interação: $p = 0,1636$, $F_{(6, 66)} = 1,591$) e a concentração de corticosterona sérica também não (tratamento: $p = 0,3514$, $F_{(1, 8)} = 0,9790$; tempo: $p = 0,0008$, $F_{(1, 8)} = 27,39$; interação: $p = 0,4808$, $F_{(1, 8)} = 0,5468$) após a exposição ao ER.

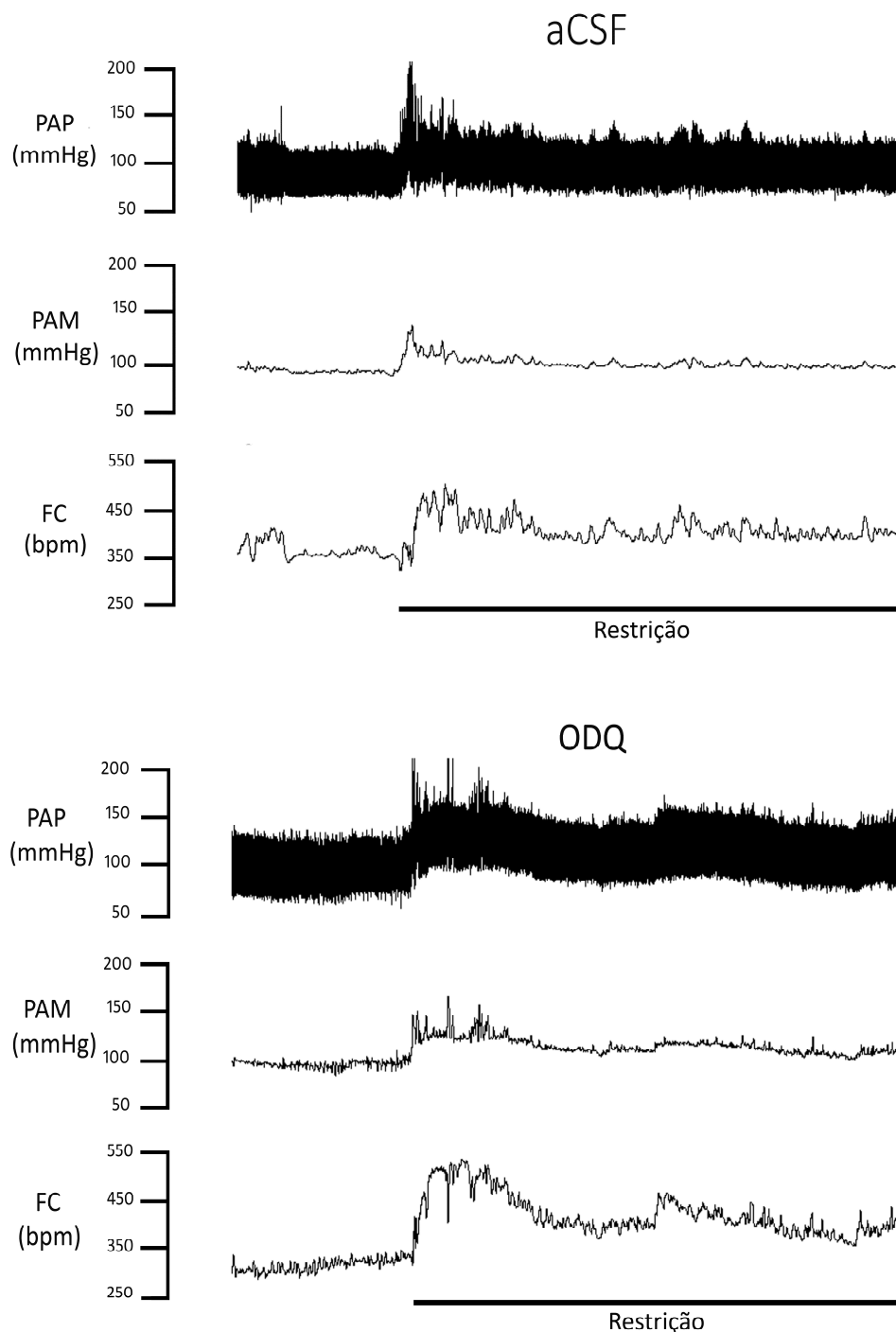
Figura 23 - Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura caudal (Δ TC) e concentração sérica de corticosterona, em animais submetidos ao estresse por restrição (ER) e tratados com ODQ.



Legenda - Variação da pressão arterial média (Δ PAM) (A), frequência cardíaca (Δ FC) (B) e temperatura caudal (Δ TC) (C) ao longo do tempo e concentração sérica de corticosterona (D), em animais submetidos ao estresse por restrição (ER) e tratados com ODQ (círculos pretos, barras pretas), um inibidor da guanilato ciclase, na dose de 1nmol/100nL, ou tratados com líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF) (círculos brancos, barras brancas). No tempo 0 os animais foram submetidos ao estresse por restrição. Os círculos e barras (corticosterona) representam os valores médios \pm EPM. * indica o tempo onde grupo ODQ apresentou diferença comparado ao grupo aCSF, através do pós teste de múltiplas comparações Bonferroni's. # indica diferença no tratamento.

Fonte: Da Autora (2020).

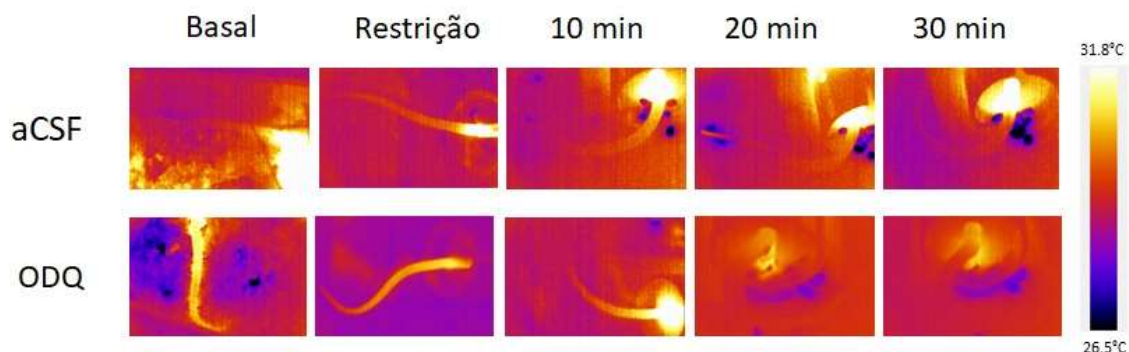
Figura 24 - Representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição, tratados com ODQ.



Legenda - Representativo de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) ao longo do experimento, em animais submetidos ao estresse por restrição. Tratados com ODQ, um inibidor da guanilado ciclase, na dose de 1nmol/100nL ou com líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF).

Fonte: Da Autora (2020).

Figura 25- Representação termográfica da variação da temperatura caudal de animais tratados com ODQ.



Legenda - Representação termográfica da variação da temperatura caudal ao longo do tempo de experimento, de animais tratados com ODQ (1nmol/100nL) e com líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF – 100nL), submetidos ao estresse por restrição.

Fonte: Da Autora (2020).

DISCUSSÃO

7 – DISCUSSÃO

O bloqueio da neurotransmissão glutamatérgica no CI, através da microinjeção de um antagonista de receptores NMDA (LY235959), bem como o bloqueio da neurotransmissão nitrérgica através da microinjeção de um inibidor específico da NOSn (NPLA), um sequestrador de NO (Carboxi-PTIO) ou um inibidor específico da formação da guanilato ciclase (ODQ), potencializaram a resposta pressora e taquicárdica em animais submetidos ao estresse agudo por restrição. Porém, a neurotransmissão glutamatérgica mediada por receptores não-NMDA, testada pela da microinjeção de NBQX, um antagonista específico para receptores não-NMDA, não alterou a PAM e FC dos animais. A modulação da redução de temperatura caudal, resposta característica desencadeada pelo estresse por restrição, não foi alterada pelo bloqueio das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica, com nenhuma das drogas utilizadas nos protocolos propostos por este trabalho.

A liberação de glicocorticoides para a circulação sistêmica mostrou-se diminuída em animais que receberam a microinjeção de NPLA e Carboxi-PTIO, demonstrando a participação da neurotransmissão nitrérgica na liberação de glicocorticoides desencadeados pela exposição ao estresse agudo. Embora estes inibidores do sistema nitrérgico tenham modificado a liberação de glicocorticoides em resposta ao estresse, a neurotransmissão glutamatérgica não apresentou o mesmo efeito, o que também ocorreu com a utilização de um inibidor da formação da guanilato ciclase (ODQ). Evidenciando a participação do NO produzido por via independente da ativação de receptores NMDA durante estresse e independente de GC/GMPc.

Possivelmente, ao longo dos anos de evolução dos vertebrados, foram selecionados diferentes sistemas de defesas, responsáveis por intermediarem as respostas necessárias para a sobrevivência das espécies. Em situações que colocam o equilíbrio homeostático em risco, como o estresse, existem vários sistemas ligados as respostas comportamentais e aos ajustes autonômicos e neuroendócrinos desencadeados. O sistema evolutivamente mais antigo utiliza regiões subcorticais, como os gânglios da base e outras regiões do mesencéfalo (STEIN; GAITHER, 1981; STEPHENSON-JONES et al., 2012) e está adaptado a responder estímulos que requerem resposta imediata, levando a comportamentos coordenados como orientação e fuga (DEAN et al., 1989; MCHAFFIE et al., 2005). Outro sistema, filogeneticamente mais recente, envolve o hipotálamo dorsomedial (HDM) e a substância cinzenta periaquidutal dorsolateral do mesencéfalo, e é dependente de impulsos de regiões cerebrais como o córtex e

amígdala. Este sistema responde bem a estímulos ameaçadores mais intensos, que requerem avaliação cognitiva, provenientes do córtex e/ou de complexos amígdaloides (DAMPNEY, 2015).

O CI possui conexões recíprocas com diversas áreas responsáveis pela manutenção do tônus basal e adaptações cardiovasculares, atividade neuroendócrinas e atividades autonômicas, entre elas: regiões como o hipotálamo, amígdala, substância cinzenta periaquidantal, núcleo do leito da estria terminal e núcleo parabraquial do hipotálamo (GOGOLLA, 2017). Sua estimulação química pode causar desde aumentos a quedas de PAM e FC, dependendo da neurotransmissão estimulada (ALVES et al., 2009b, 2011; NAGAI; HOSHIDE; KARIO, 2010; RANJBAR; HATAM; NASIMI, 2015). A microinjeção do antagonista de receptores NMDA (LY235959) no CI, demonstrou que esta área desempenha papel excitatório na modulação no componente barorreflexo do parassimpático, uma vez que o antagonismo de receptores NMDA no CI diminuiu o ganho das respostas bradicardicas, frente a aumentos na PA, apesar da microinjeção de antagonista de receptores não-NMDA não alterar a resposta barorreflexa (ALVES et al., 2009b). Esse achado, corrobora com os resultados do presente estudo, visto que o antagonismo dos receptores NMDA de glutamato, com a microinjeção de LY235959, a neurotransmissão glutamatérgica no CI deixou de exercer sua influência excitatória no parassimpático e consequente inibição nos aumentos de PA e FC, desencadeados pelo estresse por restrição o que, consequentemente, potencializou a resposta pressora desencadeada pelo ER. A confirmação de que os efeitos da neurotransmissão glutamatérgica no CI é mediada apenas por receptores NMDA, veio através da microinjeção de um antagonista de receptores não-NMDA em dose equimolar à do antagonista de receptores NMDA, que não alterou a PAM e FC dos animais. Isto sugere que a neurotransmissão glutamatérgica presente no CI possui papel inibitório no controle da atividade cardiovascular durante situações aversivas e esta resposta é mediada por receptores NMDA de glutamato. É importante ressaltar que a microinjeção dos antagonistas dos receptores NMDA e não_NMDA no CI, não alterou os valores basais de PA e FC, sugerindo que a neurotransmissão mediada por esses receptores de glutamato no CI não possui modulação tônica no controle da PA e FC.

A neurotransmissão nitrérgica está presente no córtex cerebral e em várias regiões SNC, as quais o CI possui conexões recíprocas (ALVES et al., 2009c; BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2018; MORAES RESSTEL; DE AGUIAR CORRÊA; GUIMARÃES, 2008). Nossos dados sugerem a participação desta neurotransmissão de forma inibitória sobre os aumentos de PAM e FC desencadeados pelo ER, assim como a neurotransmissão

glutamatérgica, sugerindo a participação da via NMDA/NO no CI, sobre a modulação da atividade cardiovascular. Esta via participa da modulação da atividade cardiovascular em diversas áreas do SNC e em diferentes situações (LAGATTA et al., 2018; MACHADO et al., 2016; MORAES-NETO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018). Estudamos a participação de diversos elementos essenciais para a atuação desta via como: glutamato, nNOS, NO, disponibilidade de NO e guanilato ciclase. Para isso, verificamos a ação do antagonismo de receptores NMDA para glutamato (LY235959), um sequestrador de NO (Carboxi-PTIO), um inibidor específico da NOSn (NPLA), um inibidor específico da guanilato ciclase (ODQ). Nossos resultados demonstram que ambos elementos desta via participam na modulação das respostas cardiovasculares de forma inibitória, visto que ao serem inibidas, as respostas de aumentos de PA e FC foram exacerbadas.

Apesar da neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica no CI exerceram influência inibitória sobre as respostas cardiovasculares desencadeadas pelo ER, a redução da temperatura não sofreu influência alguma destas neurotransmissões. Em situações onde o indivíduo é exposto à agentes estressores vários mecanismos são “ativados”, com finalidade de melhorar a eficiência nas respostas e priorizar órgãos e tecidos essenciais ao mecanismo de “luta ou fuga”. Para tanto, a vasoconstrição cutânea, via sistema nervoso autônomo simpático, aumenta rapidamente a temperatura interna do corpo e diminui a temperatura caudal de animais submetidos ao estresse (BLESSING; SEAMAN, 2003; JOHNSON; JR, 2018; JOHNSON; MINSON; KELLOGG, 2014; NAKAMURA; NAKAMURA, 2015). O estresse por restrição desencadeia uma série de alterações autonômicas, entre elas a vasoconstrição cutânea e consequente queda na temperatura cutânea caudal (BRASIL; FASSINI; CORRÊA, 2018; BUSNARDO et al., 2019a; VIANNA; CARRIVE, 2005). Já foi descrito a participação da via NMDA/NO modulando respostas autonômicas, que envolvem a queda de temperatura, em animais submetidos ao estresse (MORAES-NETO et al., 2014). No CI, esta relação ainda não foi demonstrada, até onde sabemos. Embora as neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgicas presente no CI modulando respostas autonômicas cardiovasculares, o mesmo não ocorre em relação a modulação da queda da temperatura caudal, sugerindo que estas neurotransmissões presentes no CI não estão envolvidas no controle destas respostas.

O óxido nítrico é uma molécula sinalizadora amplamente difundida pelo SNC (GADEK-MICHALSKA et al., 2013; GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1998). Atualmente considerado neurotransmissor atípico do SNC, apesar de não preencher as características anteriormente definidas para reconhecer uma molécula como neurotransmissor.

Sua síntese ocorre sob “demanda” e não se dá em terminais pré sinápticos, pelo contrário, podem ser sintetizados pós sinápticamente e atingir os terminais pré sinápticos (GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1998). Após atingir os terminais pré sinápticos, o NO pode desencadear a liberação de neurotransmissores típicos como: acetilcolina, noradrenalina, serotonina, dopamina e outros (CALABRESE et al., 2007). A sinalização via NO ocorre através da estimulação da guanilato ciclase, que aumenta disponibilidade de GMPc e pode regular desde a secreção de neurotransmissores, plasticidade sináptica até a neurotransmissão (KRUMENACKER; HANAFY; MURAD, 2004). Sua produção se deve através do aminoácido L-arginina, pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), catalizando a reação que forma L-citrulina e óxido nítrico (GUIX et al., 2005; LIEBERT et al., 2006; RIVIER, 2001). No cérebro, a isoforma neural da enzima óxido nítrico sintase (NOSn) é responsável pela produção e liberação de NO (GADEK-MICHALSKA et al., 2013).

O estresse agudo por restrição é um modelo de agente estressor responsável por causar além das alterações cardiovasculares, como o aumento da PA e FC, queda na temperatura cutânea, como citado anteriormente (ADAMI et al., 2017; GOMES-DE-SOUZA et al., 2019), também ativa eixos neuroendócrinos, que levam a liberação de hormônios, como a corticosterona (BUSNARDO et al., 2010, 2019b; CHOI et al., 2007; VIEIRA et al., 2018). Por ter todas estas respostas características ao ER, tornou-se um excelente modelo para se estudar vias e neurotransmissores, presentes em áreas do SNC, que são responsáveis por modularem tais ajustes fisiológicos para respostas ao estressor. Áreas suprabulbares corticolímbicas estão envolvidas na modulação dos ajustes que o agente estressor desencadeia, e que podem ser mediados tanto pelo sistema simpático, quanto parassimpático (MYERS, 2017). O CI já foi anteriormente descrito como área responsável por modular respostas desencadeadas por situações aversivas, como o ER (ALVES; CRESTANI; CORRÊA, 2010; MYERS, 2017; NAGAI; HOSHIDE; KARIO, 2010; OPPENHEIMER; CECHETTO, 2016), medo condicionado ao contexto (ALVES et al., 2013c), entre outras.

Uma das principais respostas desencadeadas pela exposição a um estímulo estressor é a ativação do eixo HPA e consequente liberação de glicocorticoides (SELYE, 1951). Os glicocorticoides são imprescindíveis para reações de defesa, preparando o organismo para desafios fisiológicos, ambientais e psicológicos. Uma das principais funções é a redistribuição energética para otimizar a sobrevivência e enfrentar um “desafio” (HERMAN et al., 2016). Esta classe de hormônios representa papel fundamental na inibição da sua própria secreção, e os mecanismos por trás da retroalimentação negativa podem ser diversificados. Podem ocorrer

de maneira rápida, agindo diretamente sobre os neurônios do NPV do hipotálamo, até mecanismos mais demorados como a inibição por processos que envolvem a transcrição genômica (HERMAN et al., 2012). Esta última opção ocorre através da ativação de sistemas límbicos como o córtex pré-frontal e hipocampo, que enviam sinais para o NPV através de neurotransmissões intermediárias (HERMAN et al., 2003; LAI; HERMAN, 2009). Já foi descrito a existência de receptores de glicocorticoides (RG) no CI (FORNARI et al., 2012), essa informação sugere a participação da área na modulação da liberação de glicocorticoides em resposta ao estresse, e também na retroalimentação negativa do eixo.

Os resultados demonstram a participação do óxido nítrico na liberação de glicocorticoides através de uma via independente de GC/GMPc mas dependente de nNOS e formação de NO, já que a microinjeção de um sequestrador de NO no CI também foi capaz de diminuir os níveis circulantes de glicocorticoides durante o ER. O NO é uma molécula muito versátil, capaz de atuar por diversas vias. Além da via mais comumente descrita, onde sua atuação é dependente do aumento de GMPc intracelular, podendo atuar por vias independentes de GMPc (CHACHLAKI; PREVOT, 2019; FEIL; KLEPPISCH, 2008; STAMLER et al., 1997). Apesar de serem vias com caminhos totalmente diferentes, a existência da atuação de uma destas, não exclui a possibilidade da outra estar presente no mesmo local (STAMLER et al., 1997). Vias independentes da sinalização do NO através de GMPc/GC podem atuar de três formas: (i) NO modulando proteínas através da ribosilação de ADP e posterior modulação de funções neuronais (SCHUMAN et al., 1994; SULLIVAN; WONG; SCHUMAN, 1997; ZHANG et al., 1994). (ii) NO originando espécies de radicais livres, que alteram a função celular. (iii) NO modulando função celular através da s-nitrosilação de várias proteínas (RICCIO et al., 2006) levando a mudança da função de canais iônicos e consequente alteração da atividade neuronal (BROILLET; FIRESTEIN, 1996, 1997; JAFFREY et al., 2001).

A via que utiliza a ribosilação de ADP foi descrita como modulatória da atividade do hipocampo (SCHUMAN et al., 1994; SULLIVAN; WONG; SCHUMAN, 1997), região límbica, assim como o CI. A ribosilação de ADP ocorre através da modificação pós-traducional de proteínas nucleares, catalisada pela enzima Poly ADP-ribose polimerase (PARP), onde ocorre a adição de grupos ADP-ribose (ADPr) de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) à proteínas (PALAZZO; MIKOČ; AHEL, 2017; PERINA et al., 2014). Este mecanismo pode atuar na replicação ou reparação de DNA, expressão de genes, (POSAVEC MARJANOVIĆ; CRAWFORD; AHEL, 2017), apoptose, envelhecimento, divisão celular, patogenicidade microbiana (CORDA, 2003; GIBSON; KRAUS, 2012;

PALAZZO; MIKOC; AHEL, 2017), estimulação do sistema imune (PAGE et al., 1998; SHEFFLER et al., 1995; YU et al., 2007).

Outra forma importante de atuação de NO é a S-nitrosilação, que consiste em uma modificação covalente pós-traducional que adiciona um grupo nitrosil ao grupo tiol de uma cisteína para formar S-nitrosotiol (FERNANDO et al., 2019; HESS et al., 2005). Esta mudança na estrutura da proteína pode levar a outras interações proteína-proteína que podem desencadear uma série de outras modificações pós-traducionais, como acetilação, ubiquitinação e fosforilação, levando a uma cascata de reações que culmina na ação final do NO (FERNANDO et al., 2019; HESS et al., 2005; MARTÍNEZ-RUIZ; LAMAS, 2004). A s-nitrosilação pode regular diversos processos biológicos que vão desde a renovação de proteínas, regulação da transcrição, apoptose até a síntese de esteroides (FERNANDO et al., 2019). Desta forma, existe a possibilidade de após formado, NO atuar por mecanismos neuroquímicos independentes de glutamato no CI.

A neurotransmissão nitrérgica atuou no CI, para modular a liberação de glicocorticoides, através de via dependente de nNOS. A isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (nNOS) é apontada como a principal responsável pela formação de NO no SNC. A ativação de receptores NMDA e consequente ativação desta enzima, por vias dependentes de Ca^{2+} /Calmodulina, é o mecanismo mais bem caracterizado para ativação da nNOS no SNC. Entretanto, a microinjeção de um antagonista de receptores NMDA não alterou a liberação de glicocorticoides. Apesar dos resultados demonstrarem a participação da via NO na modulação neuroendócrina ativada pelo ER por vias independentes de glutamato, não podemos descartar a participação da via NMDA na ativação de nNOS. Novos experimentos podem verificar a participação desta neurotransmissão ao longo do tempo de estresse, com diferentes concentrações de antagonista de receptores NMDA, para então excluir esta possibilidade. Entretanto, esta contradição pode ser explicada se levarmos em conta a participação de outra neurotransmissão no CI, modulando a liberação de glicocorticoides desencadeados por evento estressante, aumentando o Ca^{2+} intracelular, que levaria a ativação da nNOS. A neurotransmissão colinérgica, por exemplo, pode ser responsável por ativar a cascata de formação de NO, visto que o receptor nicotínico é altamente permeável ao Ca^{2+} (SHOOP et al., 2001; SIVILOTTI; COLQUHOUN, 1995). Já foi demonstrado que esta neurotransmissão está abundantemente presente no CI e pode modular diversas funções (FERRIER et al., 2015; RODRÍGUEZ-GARCÍA; MIRANDA, 2016; TOYODA, 2019a, 2019b). A microinjeção de nicotina no NTS aumentou concentração de nitrato, um metabólito do NO (CHENG et al.,

2011). Em neurônios do NTS, receptores nicotínicos de ACh mediaram o aumento da produção de NO (PAPADOPOLOU et al., 2004; ZAYAS et al., 2002; ZHAO; CHEN; SHARP, 2007). Além disso, o aumento na produção de NO desencadeado pelo receptor nicotínico de ACh parece ser dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CHENG et al., 2011), via imprescindível para ativação da enzima NOS e posterior formação de NO.

Por fim, os dados sugerem que a participação das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica presentes no CI, ocorre por vias diferentes sobre as respostas cardiovasculares e neuroendócrinas. Desta forma, receptores NMDA de glutamato, NO formado, disponibilidade de NO e GC participam da modulação das alterações cardiovasculares, de forma inibitória sobre as respostas taquicárdica e pressórica que são desencadeadas pelo estresse. Porém, a modulação da liberação de corticosterona pela neurotransmissão nitrérgica ocorre por mecanismos independentes destes elementos da via NMDA/NO/GC, mas dependentes de nNOS e da formação de NO.

CONCLUSÃO

8 – CONCLUSÃO

Os dados demonstram que as neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica no CI modulam as respostas cardiovasculares, desencadeadas pelo ER, de forma inibitória sobre respostas taquicárdicas e pressórica. Porém, a modulação da liberação de corticosterona pela neurotransmissão nitrérgica ocorre por mecanismos independentes de receptores NMDA e GC, mas dependentes de nNOS e da formação de NO. Além disso, o controle da modulação da temperatura caudal não é mediado pelas neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica presentes no CI. Sugere-se que a participação das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica, presentes no CI, ocorre por vias diferentes sobre as respostas cardiovasculares e neuroendócrinas desencadeadas pelo estresse.

REFERÊNCIAS

9- REFERÊNCIAS

- ADAMI, M. B. et al. Both N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 674–681, 2017.
- AHN, J. Y. et al. Activation of immediate-early response gene c-Fos protein in the rat paralimbic cortices after myocardial infarction. **Neural Regeneration Research**, v. 10, n. 8, p. 1251–1257, 2015.
- ALEKSANDROV, V. G.; ALEKSANDROVA, N. P. The role of the insular cortex in the control of visceral functions. **Human Physiology**, v. 41, n. 5, p. 553–561, 2015.
- ALVES, F. H. F. et al. Insular cortex α 1-adrenoceptors modulate the parasympathetic component of the baroreflex in unanesthetized rats. **Brain Research**, v. 1295, p. 119–126, 2009a.
- ALVES, F. H. F. et al. N-methyl-d-aspartate receptors in the insular cortex modulate baroreflex in unanesthetized rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 147, n. 1–2, p. 56–63, 2009b.
- ALVES, F. H. F. et al. Bed nucleus of the stria terminalis N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide modulate the baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 7, p. 1703–1711, 2009c.
- ALVES, F. H. F. et al. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjected into the insular cortex of unanesthetized rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 160, n. 1–2, p. 90–98, 2011.
- ALVES, F. H. F. et al. Involvement of the insular cortex in the consolidation and expression of contextual fear conditioning. v. 38, n. March, p. 2300–2307, 2013a.
- ALVES, F. H. F. et al. Involvement of the insular cortex in the consolidation and expression of contextual fear conditioning. **European Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 2, p. 2300–2307, 2013b.
- ALVES, F. H. F. et al. Involvement of the insular cortex in the consolidation and expression of contextual fear conditioning. **European Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 2, p. 2300–2307, 2013c.
- ALVES, F. H. F.; CRESTANI, C. C.; CORRÊA, F. M. A. The insular cortex modulates cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Brain Research**, v. 1333, p. 57–63, 2010.
- ANAND, B. K.; DUA, S. Circulatory and respiratory changes induced by electrical stimulation of limbic system (visceral brain). **J Neurophysiol**, v. 19, n. 5, p. 393–400, 1956.
- BARRETTO-DE-SOUZA, L. et al. Nitric oxide-cGMP-PKG signaling in the bed nucleus of the stria terminalis modulates the cardiovascular responses to stress in male rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 75–84, 2018.

BARRON, B. A.; VAN LOON, G. R. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 28, n. 2, p. 179–187, 1989.

BENINI, R. et al. Habituation of the cardiovascular responses to restraint stress in male rats: influence of length, frequency and number of aversive sessions. **Stress**, v. 22, n. 1, p. 151–161, 2019.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: Beyond monoamines. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 137–151, 2006.

BETZ, C. S. et al. Optical diagnostic methods for early tumour diagnosis in the upper aerodigestive tract. Quo vadis? **Hno**, v. 64, n. 1, p. 41–48, 2016.

BLESSING, W. W.; SEAMAN, B. 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptors regulate sympathetic nerves constricting the cutaneous vascular bed in rabbits and rats. **Neuroscience**, v. 117, n. 4, p. 939–948, 2003.

BRASIL, T. F. S.; FASSINI, A.; CORRÊA, F. M. AT₁ and AT₂ Receptors in the Prelimbic Cortex Modulate the Cardiovascular Response Evoked by Acute Exposure to Restraint Stress in Rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 1, p. 305–316, 2018.

BROILLET, M. C.; FIRESTEIN, S. Direct activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel through modification of sulfhydryl groups by NO compounds. **Neuron**, v. 16, n. 2, p. 377–385, 1996.

BROILLET, M. C.; FIRESTEIN, S. β subunits of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel form a nitric oxide activated Ca²⁺ channel. **Neuron**, v. 18, n. 6, p. 951–958, 1997.

BURFORD, N. G.; WEBSTER, N. A.; CRUZ-TOPETE, D. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Modulation of Glucocorticoids in the Cardiovascular System. n. Figure 1, p. 1–16, 2017.

BUSNARDO, C. et al. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 158, n. 1–2, p. 51–57, 2010.

BUSNARDO, C. et al. Nitrgic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 90, n. October 2018, p. 16–27, 2019a.

BUSNARDO, C. et al. Nitrgic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 90, p. 16–27, 2019b.

BUTCHER, K. S.; CECHETTO, D. F. Autonomic responses of the insular cortex in hypertensive and normotensive rats. **The American journal of physiology**, v. 268, n. 1 Pt 2, p. R214–22, 1995.

CA, R. B. B. et al. Breathlessness in humans activates insular cortex. v. 11, n. 10, p. 2117–

2120, 2000.

CALABRESE, V. et al. Nitric oxide in the central nervous system : neuroprotection versus neurotoxicity. v. 8, n. october, 2007.

CAMARGO, L. H. A. et al. Involvement of N-methyl-d-aspartate glutamate receptor and nitric oxide in cardiovascular responses to dynamic exercise in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 713, n. 1–3, p. 16–24, 2013.

CECHETTO, D. F. Cortical control of the autonomic nervous system. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 2, p. 326–331, 2014.

CECHETTO, D. F.; CHEN, S. J. Hypothalamic and cortical sympathetic responses relay in the medulla of the rat. **Am J Physiol**, v. 263, n. 3 Pt 2, p. R544-52, 1992.

CHACHLAKI, K.; PREVOT, V. Nitric oxide signalling in the brain and its control of bodily functions. **British Journal of Pharmacology**, 2019.

CHAPPELL, A. S. et al. A crossover, add-on trial of talampanel in patients with refractory partial seizures. **Neurology**, v. 58, n. 11, p. 1680–1682, 2002.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the Stress Response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, n. 1, p. 259–284, 2005.

CHENG, P. W. et al. Central nicotinic acetylcholine receptor involved in Ca²⁺-calmodulin-endothelial nitric oxide synthase pathway modulated hypotensive effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 6, p. 1203–1213, 2011.

CHOI, D. C. et al. Bed Nucleus of the Stria Terminalis Subregions Differentially Regulate Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity: Implications for the Integration of Limbic Inputs. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 8, p. 2025–2034, 2007.

CORDA, D. NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 9, p. 1953–1958, 2003.

CUNANAN, A. J. et al. The General Adaptation Syndrome: A Foundation for the Concept of Periodization. **Sports Medicine**, v. 48, n. 4, p. 787–797, 2018.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 2, p. 323–364, 2017.

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

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

DAMPNEY, R. A. L. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. **Advances in Physiology Education**, v. 40, n. 3, p. 283–296, 2016.

DEAN, P. et al. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior

colliculus. v. 12, n. 4, p. 408–413, 1989.

DELGADO, J. . Circulatory effects of cortical stimulation. **Physiol Rev Suppl**, v. 4, p. 146–78, 1960.

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

DO, K. Q. et al. Glial-neuronal transfer of arginine and S-nitrosothiols in nitric oxide transmission. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 962, p. 81–92, 2002.

DOMIN, H. et al. Antidepressant-like effect of the mGluR5 antagonist MTEP in an astroglial degeneration model of depression. v. 273, p. 23–33, 2014.

DORI, I. et al. Proportion of glutamate- and aspartate-immunoreactive neurons in the efferent pathways of the rat visual cortex varies according to the target. **J Comp Neurol.**, v. 319, p. 191–204, 1992.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. 2006.

DUMAN, R. S.; VOLETI, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 1, p. 47–56, 2012.

EVARD, H. C. The organization of the primate insular cortex. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 13, n. May, p. 1–21, 2019.

FALKENSTEIN, E. et al. Multiple Actions of Steroid Hormones — A Focus on Rapid , Nongenomic Effects. v. 52, n. 4, p. 513–555, 2000.

FASSINI, A. et al. Opioid receptors in the prelimbic cortex modulate restraint stress-induced cardiovascular responses in the rat. **Neuropharmacology**, v. 85, n. May, p. 367–374, 2014.

FASSINI, A. et al. κ -Opioid receptors in the infralimbic cortex modulate the cardiovascular responses to acute stress. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 4, p. 377–387, 2015a.

FASSINI, A. et al. The prelimbic cortex muscarinic M3 receptor-nitric oxide-guanylyl cyclase pathway modulates cardiovascular responses in rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 93, n. 5, p. 830–838, 2015b.

FEIL, R.; KLEPPISCH, T. NO / cGMP-Dependent Modulation of Synaptic Transmission. **Pharmacology of Neurotransmitter Release**, p. 529–560, 2008.

FERNANDO, V. et al. S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 404, 2019.

FERREIRA-JUNIOR, N. C. et al. Medial prefrontal cortex N-methyl-D-aspartate receptor/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway modulates both tachycardic and bradycardic baroreflex responses. **Journal of Neuroscience Research**, v. 91, n. 10, p. 1338–1348, 2013.

FERRIER, J. et al. Cholinergic neurotransmission in the posterior insular cortex is altered in preclinical models of neuropathic pain: Key role of muscarinic M2 receptors in donepezil-induced antinociception. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 50, p. 16418–16430, 2015.

FLECK, M. W. et al. Aspartate and glutamate mediate excitatory synaptic transmission in area CA1 of the hippocampus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 13, n. September, p. 3944–3955, 1993.

FORNARI, R. V. et al. Involvement of the insular cortex in regulating glucocorticoid effects on memory consolidation of inhibitory avoidance training. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, n. MARCH 2012, p. 1–11, 2012.

GADEK-MICHALSKA, A. et al. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. **Pharmacological Reports**, v. 65, p. 1655–1662, 2013.

GALPERN, W. et al. NGF attenuates 3-nitrotyrosine formation in a 3-NP model of Huntington's disease. **Neuroreport**, v. 7, p. 2639–42, 1996.

GARRY, P. S. et al. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment - From bench to bedside. **Experimental Neurology**, v. 263, p. 235–243, 2015.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v. 336, p. 385–8, 1998.

GEHRLACH, D. A. et al. Aversive state processing in the posterior insular cortex. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 9, p. 1424–1437, 2019.

GIBSON, B. A.; KRAUS, W. L. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 7, p. 411–424, 2012.

GOGOLLA, N. The insular cortex. **Current Biology**, v. 27, n. 12, p. R580–R586, 2017.

GOLDEINSTEIN, D. S. Central catecholamines and the control of sympathetic tone. **Central neural mechanisms in cardiovascular regulation**, v. 02, 1992.

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

GRIFFITH, O. W.; STUEH, D. NITRIC OXIDE SYNTHASES : Mechanism. **Direct**, 1995.

GUIX, F. X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. v. 76, p. 126–152, 2005.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335–346, 2006.

HAN, J. et al. Plasticity-related PKM ζ signaling in the insular cortex is involved in the modulation of neuropathic pain after nerve injury. **Neural Plasticity**, v. 2015, n. 1c, 2015.

HANAMORI, T. et al. Neurons in the posterior insular cortex are responsive to gustatory stimulation of the pharyngolarynx, baroreceptor and chemoreceptor stimulation, and tail pinch in rats. p. 97–106, 1998.

HANSEN, K. B. et al. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. v. 150, n. 8, 2018.

HARDY, S. G. P.; HOLMES, D. E. Experimental Brain Research 9. **Experimental Brain Research**, v. 73, p. 249–255, 1998.

HARDY, S. G. P.; MACK, S. M. Experimental Brain Research 9. **Experimental Brain Research**, v. 79, p. 393–399, 1990.

HASHIMOTO, K. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry The role of glutamate on the action of antidepressants. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1558–1568, 2011.

HERMAN, J. P. et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo – pituitary – adrenocortical responsiveness. v. 24, p. 151–180, 2003.

HERMAN, J. P. et al. Neural regulation of the stress response: Glucocorticoid feedback mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 292–298, 2012.

HERMAN, J. P. et al. Regulation of the hypothalamic-pituitary- adrenocortical stress response. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 2, p. 603–621, 2016.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E.; HERMAN, J. P. 1-s2.0-S0166223696100692-main.pdf. v. 2236, n. Table 1, 1997.

HESS, D. T. et al. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 2, p. 150–166, 2005.

HUETHER, G. et al. The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. **Psychiatry Research**, v. 87, n. 1, p. 83–95, 1999.

IMBE, H. et al. Repeated forced swim stress enhances CFA-evoked thermal hyperalgesia and affects the expressions of pCREB and c-Fos in the insular cortex. **Neuroscience**, v. 259, p. 1–11, 2013.

JACOBSON, L.; SAPOLSKY, R. The Role of the Hippocampus in Feedback Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis*. v. 12, n. 2, p. 118–134, 1991.

JAFFREY, S. R. et al. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. February, p. 193–197, 2001.

JENNER, P.; OLANOW, C. W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 47, p. S161-70, 1996.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. v. 10, n. juNE, p. 459–466, 2009.

JOHNSON, J. M.; JR, D. L. K. **Skin vasoconstriction as a heat conservation**

thermoeffector. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 156

JOHNSON, J. M.; MINSON, C. T.; KELLOGG, D. L. Cutaneous Vasodilator and Vasoconstrictor Mechanisms in Temperature Regulation. v. 4, n. January, p. 33–89, 2014.

KHODOROV, B. **Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones**. [s.l.: s.n.]. v. 86

KIMMERLY, D. S. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical A review of human neuroimaging investigations involved with central autonomic regulation of barorefl ex-mediated cardiovascular control. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, n. March, p. 0–1, 2017.

KRAUS, C. et al. Prognosis and improved outcomes in major depression: a review. **Translational Psychiatry**, v. 9, n. 1, 2019.

KRUMENACKER, J. S.; HANAFY, K. A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. v. 62, p. 505–515, 2004.

LAGATTA, D. C. et al. Medial prefrontal cortex TRPV1 and CB1 receptors modulate cardiac baroreflex activity by regulating the NMDA receptor/nitric oxide pathway. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 470, n. 10, p. 1521–1542, 2018.

LAI, Y. M. U.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. v. 10, n. juNe, 2009.

LIEBERT, M. A. et al. Redox Regulation of Heat Shock Protein Expression by Signaling Involving Nitric Oxide and Carbon Monoxide : Relevance to. v. 8, 2006.

LISBOA, S. F. et al. Complex interaction between anandamide and the nitrenergic system in the dorsolateral periaqueductal gray to modulate anxiety-like behavior in rats. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 86–94, 2013.

LISBOA, S. F. et al. Increased contextual fear conditioning in inos knockout mice: Additional evidence for the involvement of nitric oxide in stress-related disorders and contribution of the endocannabinoid system. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 8, p. 1–12, 2015.

LO, H. et al. Involvement of NMDA Receptors, Nitric Oxide, and GABA in Rostral Ventrolateral Medulla in Acute Ethanol-Induced Cardiovascular Responses in Rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 42, n. 8, p. 1418–1430, 2018.

LOEWY, A. D. Forebrain nuclei involved in autonomic control. v. 87, 1991.

LOEWY, A. D.; MCKELLAR, S. S. The neuroanatomical basis of central cardiovascular control. **Fed Proc.**, v. Jun;39(8), p. 2495–503, 1980.

LUGOBONI, F. et al. Depression in patients with cardiovascular disease. **Ann Ital Med Int**, v. 20, p. 224–32, 2005.

MACHADO, N. L. S. et al. Nitric oxide modulates blood pressure through NMDA receptors in the rostral ventrolateral medulla of conscious rats. **Brain Research**, v. 1643, p. 159–167,

2016.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; LAMAS, S. S-nitrosylation: A potential new paradigm in signal transduction. **Cardiovascular Research**, v. 62, n. 1, p. 43–52, 2004.

MAYDYCH, V. The interplay between stress, inflammation, and emotional attention: Relevance for depression. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. APR, p. 1–8, 2019.

MAZZITELLI, M. et al. Group II Metabotropic Glutamate Receptors: Role in Pain Mechanisms and Pain Modulation. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. October, p. 1–11, 2018.

MCALLEN, R. M.; SPYER, K. M. Preganglionic motoneurons. **J. Physiol.**, v. 258, p. 187–204, 1976.

MCCONNELL, S. et al. The relationship between depression and cardiovascular disease. **International Journal of Psychiatry in Clinical Practice**, v. 9, n. 3, p. 157–167, 2005.

MCDUGALL, S. J. et al. Restraint Stress. **Hypertension - Journal of the American Association**, v. 35, p. 126–129, 2000.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: From serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v. 886, n. 1–2, p. 172–189, 2000.

MCEWEN, B. S. et al. Mechanisms of stress in the brain. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1353–1363, 2015.

MCEWEN, B. S.; SEEMAN, T. Protective and Damaging Effects of Mediators of Stress Elaborating and Testing the Concepts of Allostasis and Allostatic Load. **ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES**, v. 8624, p. 30–47, 1999.

MCHAFFIE, J. G. et al. Subcortical loops through the basal ganglia. v. 28, n. 8, 2005.

MEYER, S.; STRITTMATTER, M.; FISCHER, C. A. C. Lateralization in autonomic dysfunction in ischemic stroke involving the insular cortex. v. 15, n. 2, 2004.

MORA, F. et al. Stress , neurotransmitters , corticosterone and body – brain integration. **Brain Research**, v. 1476, p. 71–85, 2012.

MORAES-NETO, T. B. et al. Involvement of dorsal hippocampus glutamatergic and nitergic neurotransmission in autonomic responses evoked by acute restraint stress in rats. **Neuroscience**, v. 258, p. 364–373, 2014.

MORAES RESSEL, L. B.; DE AGUIAR CORRÊA, F. M.; GUIMARÃES, F. S. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 18, n. 9, p. 2027–2035, 2008.

MYERS, B. Corticolimbic regulation of cardiovascular responses to stress. **Physiology and Behavior**, v. 172, p. 49–59, 2017.

NAGAI, M. et al. The Insular Cortex and Takotsubo Cardiomyopathy. **Current**

Pharmaceutical Design, v. 23, n. 6, p. 879–888, 2016.

NAGAI, M.; HOSHIDE, S.; KARIO, K. The insular cortex and cardiovascular system: A new insight into the brain-heart axis. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 4, n. 4, p. 174–182, 2010.

NAKAMURA, K.; NAKAMURA, K. Neural circuit for psychological stress-induced hyperthermia Neural circuit for psychological stress-induced hyperthermia. v. 8940, n. March 2016, 2015.

NICIU, M. J. et al. Glutamate Receptor Antagonists as Fast-Acting Therapeutic Alternatives for the Treatment of Depression: Ketamine and Other Compounds. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 54, n. 1, p. 119–139, 2014.

OLIVEIRA, L. A. et al. 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**, v. 89, n. January, p. 168–176, 2018.

OLIVIER, P. et al. Nitric Oxide Plays a Key Role in Myelination in the Developing Brain. v. 69, n. 8, p. 828–837, 2010.

OPPENHEIMER, S.; CECHETTO, D. The insular cortex and the regulation of cardiac function. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 2, p. 1081–1133, 2016.

PAGE, C. LE et al. Inhibitors of ADP-Ribosylation impair inducible nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF kappa B activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 243, n. 2, p. 451–457, 1998.

PALAZZO, L.; MIKOC, A.; AHEL, I. ADP-RIBOSYLATION: new facets of an ancient modification. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2017.

PALAZZO, L.; MIKOČ, A.; AHEL, I. ADP-ribosylation: new facets of an ancient modification. **FEBS Journal**, v. 284, n. 18, p. 2932–2946, 2017.

PAPADOPOLOU, S. et al. Nicotinic receptor mediated stimulation of NO-generation in neurons of rat thoracic dorsal root ganglia. **Neuroscience Letters**, v. 361, n. 1–3, p. 32–35, 2004.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**, 1997.

PEETERS, B. ; BROWKAMP, C. L. Involvement of corticosteroids in the processing of stressful life-events. A possible implication for the development of depression. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 49, p. 417–27, 1994.

PERINA, D. et al. Distribution of protein poly(ADP-ribosyl)ation systems across all domains of life. **DNA Repair**, v. 23, p. 4–16, 2014.

PIN, J. P.; GALVEZ, T.; PRÉZEAU, L. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 98, n. 3, p. 325–354, 2003.

PLANTE, G. E. Depression and cardiovascular disease: A reciprocal relationship.

Metabolism: Clinical and Experimental, v. 54, n. 5 SUPPL., p. 45–48, 2005.

POSAVEC MARJANOVIĆ, M.; CRAWFORD, K.; AHREL, I. PARP, transcription and chromatin modeling. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 63, p. 102–113, 2017.

POST, R. . Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **Am J Psychiatry**, v. 149, p. 999–1010, 1992.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. <NO as modulator of synaptic function.pdf>. v. 64, p. 51–68, 2001.

PUGLIESI PAJOLLA, G.; MORGAN DE AGUIAR CORRÊA, F. Cardiovascular responses to the injection of l-glutamate in the lateral hypothalamus of unanesthetized or anesthetized rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 116, n. 1–2, p. 19–29, 2004.

RADLEY, J. J.; SAWCHENKO, P. E. A common substrate for prefrontal and hippocampal inhibition of the neuroendocrine stress response. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 26, p. 9683–9695, 2011.

RANJBAR, A.; HATAM, M.; NASIMI, A. Cardiovascular and single-unit responses to l-glutamate injection into the posterior insular cortex in rat. **Neuroscience**, v. 306, p. 63–73, 2015.

RIBEIRO, F. M.; PIRES, R. G. W.; FERGUSON, S. S. G. Huntington's disease and group I metabotropic glutamate receptors. **Molecular Neurobiology**, v. 43, n. 1, p. 1–11, 2011.

RICCIO, A. et al. A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. **Molecular Cell**, v. 21, n. 2, p. 283–294, 2006.

RIEDEMANN, T. et al. Corticosteroids : way upstream. p. 1–20, 2010.

RIVIER, C. Role of Gaseous Neurotransmitters in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. **Ann. NY Acad.**, v. 933, p. 254–264, 2001.

RIVIER, C.; VALE, W. rivier and vale, 1983, synergistic effect of VP and CRh.pdf. **Nature**, v. 305, p. 325–327, 1983.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, G.; MIRANDA, M. I. Opposing roles of cholinergic and GABAergic activity in the insular cortex and nucleus basalis magnocellularis during novel recognition and familiar taste memory retrieval. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 6, p. 1879–1889, 2016.

ROUSSEAU, C. G. A review of glutamate receptors I: Current understanding of their biology. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 21, n. 1, p. 25–51, 2008.

RUGGIERO, D. A. et al. A role of insular cortex in cardiovascular function. **Journal of Comparative Neurology**, v. 257, n. 2, p. 189–207, 1987.

RUMSFELD, J. S.; HO, P. M. Depression and cardiovascular disease: A call for recognition. **Circulation**, v. 111, n. 3, p. 250–253, 2005.

SÁNTHA, P. et al. Restraint stress-induced morphological changes at the blood-brain barrier

in adult rats. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, n. JAN2016, p. 1–15, 2016.

SCHEEFHALS, N.; MACGILLAVRY, H. D. Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 91, p. 82–94, 2018.

SCHUMAN, E. M. et al. An ADP-ribosyltransferase as a potential target for nitric oxide action in hippocampal long-term potentiation. v. 91, n. December, p. 11958–11962, 1994.

SCHUMAN, E. M.; MADISON, D. V. NITRIC OXIDE AND. 1994.

SELYE, H. The general adaptation syndrome. **Annu. Rev. Med.**, v. 2, p. 327–342, 1951.

SELYE, H. *Psychiatry* 1'2. p. 423–427, 1956.

SELYE, H. Confusion and controversy in the stress field. **Journal of Human Stress**, v. 1, n. 2, p. 37–44, 1975.

SHEFFLER, L. A. et al. Characterization of nitric oxide-stimulated ADP-ribosylation of various proteins from the mouse macrophage cell line ANA-1 using sodium nitroprusside and the novel nitric oxide-donating compound diethylamine dinitric oxide. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 57, n. 1, p. 152–159, 1995.

SHOOP, R. D. et al. Synaptically driven calcium transients via nicotinic receptors on somatic spines. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 771–781, 2001.

SIVILOTTI, L.; COLQUHOUN, D. Acetylcholine Receptors : Minisatellites and Human Disease. v. 269, n. September, p. 1681–1682, 1995.

SLIZ, D.; HAYLEY, S. Major depressive disorder and alterations in insular cortical activity: A review of current functional magnetic imaging (fMRI) research. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 6, n. NOVEMBER 2012, p. 1–14, 2012.

SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 383–395, 2006.

SPRENGELMEYER, R. et al. The insular cortex and the neuroanatomy of major depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 133, n. 1–2, p. 120–127, 2011.

STAMLER, J. S. et al. (S) NO Signals : Translocation , Regulation , and a Consensus Motif. v. 18, p. 691–696, 1997.

STEIN, B. E.; GAITHER, N. S. Sensory Representation in Reptilian Optic Tectum : Some Comparisons With Mammals. v. 87, p. 69–87, 1981.

STEPHENSON-JONES, M. et al. Evolution of the Basal Ganglia : Dual-Output Pathways Conserved Throughout Vertebrate Phylogeny. v. 2973, p. 2957–2973, 2012.

STEPTOE, A.; KIVIMÄKI, M. Die Bedeutung Der Kraftwerksgruppe Glockner-Kaprun in Den Nachkriegsjahren. **Nature Reviews Cardiology**, v. 9, n. 9, p. 360–370, 2012.

SULLIVAN, B. M.; WONG, S.; SCHUMAN, E. M. Modification of hippocampal synaptic

proteins by nitric oxide- stimulated ADP Ribosylation. **Learning and Memory**, v. 3, n. 5, p. 414–424, 1997.

SZABO, S.; TACHE, Y.; SOMOGYI, A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: A retrospective 75 years after his landmark brief “letter” to the Editor#of Nature. **Stress**, v. 15, n. 5, p. 472–478, 2012.

TAQATQEH, F. et al. More than a Retrograde Messenger: Nitric Oxide Needs Two cGMP Pathways to Induce Hippocampal Long-Term Potentiation. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 29, p. 9344–9350, 2009.

TAYLOR, E. W.; JORDAN, D.; COOTE, J. H. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 3, p. 855–916, 1999.

TODA, N.; OKAMURA, T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 271–324, 2003.

TOYODA, H. Role of nicotinic acetylcholine receptors for modulation of microcircuits in the agranular insular cortex. **Journal of Oral Biosciences**, v. 61, n. 1, p. 5–11, 2019a.

TOYODA, H. Nicotinic activity layer specifically modulates synaptic potentiation in the mouse insular cortex. **European Journal of Neuroscience**, v. 50, n. 3, p. 2211–2223, 2019b.

TRABACE, L.; KENDRICK, K. M. Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 4, p. 1664–1674, 2000.

TSAI, C. Y. et al. Ablation of hippocampal neurogenesis in mice impairs the response to stress during the dark cycle. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–7, 2015.

UEMATSU, A. et al. Correlation between activation of the prelimbic cortex, basolateral amygdala, and agranular insular cortex during taste memory formation. **Cerebral Cortex**, v. 25, n. 9, p. 2719–2728, 2015.

VACCARINO, V. et al. Depression and coronary heart disease: 2018 ESC position paper of the working group of coronary pathophysiology and microcirculation developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines. **European Heart Journal**, p. 1–15, 2019.

VAN DER KOOIJ, M. A. et al. Role for MMP-9 in stress-induced downregulation of nectin-3 in hippocampal CA1 and associated behavioural alterations. **Nature Communications**, v. 5, n. May, p. 1–11, 2014.

VAREJKOVA, E.; JANISOVA, K.; MYSLIVECEK, J. Acute restraint stress modifies the heart rate biorhythm in the poststress period. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.

VERBERNE, A. J. et al. Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society Symposium: Central Autonomic Regulation CENTRAL NERVOUS SYSTEM CONTROL OF CARDIOVASCULAR FUNCTION: NEURAL MECHANISMS AND NOVEL MODULATORS. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 24,

n. April, p. 743–747, 1997.

VIANNA, D. M. L.; CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 9, p. 2505–2512, 2005.

VIEIRA, J. O. et al. Influence of pre-existing hypertension on neuroendocrine and cardiovascular changes evoked by chronic stress in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 97, n. June, p. 111–119, 2018.

WANG, H. et al. Presynaptic and Postsynaptic Roles of NO , cGK , and RhoA in Long-Lasting Potentiation and Aggregation of Synaptic Proteins. v. 45, n. 2001, p. 389–403, 2005.

WANG, Q. et al. Nitric oxide/cGMP signaling via guanylyl cyclase isoform 1 modulates glutamate and GABA release in somatosensory cortex of mice. **Neuroscience**, v. 360, n. 1, p. 180–189, 2017.

XU, G. et al. Restraint stress induced hyperpermeability and damage of the blood-brain barrier in the amygdala of adult rats. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, n. February, p. 1–15, 2019.

YANG, L. et al. The Effects of Psychological Stress on Depression. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 4, p. 494–504, 2015.

YARIBEYGI, H. et al. The impact of stress on body function: A review. **EXCLI Journal**, v. 16, p. 1057–1072, 2017.

YASUI, Y. et al. Autonomic Responses and Efferent Pathway From the Insular Cortex in the Rat. **the Journal of Comparative Neurology**, v. 303, p. 355–374, 1991.

YOUNG, L. T. Norepinephrine in depression and mood disorders La norépinéphrine dans la dépression et les troubles psychiques Postreceptor pathways for signal transduction in depression and bipolar disorder. v. 26, p. 17–22, 2001.

YU, H. N. et al. Activation of NUDT5, an ADP-ribose pyrophosphatase, by nitric oxide-mediated ADP-ribosylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 354, n. 3, p. 764–768, 2007.

ZAYAS, R. M. et al. Nicotinic-acetylcholine receptors are functionally coupled to the nitric oxide/cGMP-pathway in insect neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 83, n. 2, p. 421–431, 2002.

ZHANG, G. et al. Combined use of spatial restraint stress and middle cerebral artery occlusion is a novel model of post-stroke depression in mice. **Scientific Reports**, v. 5, n. October, p. 1–9, 2015.

ZHANG, J. et al. Nitric oxide Activation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase in Neurotoxicity. **SCIENCE**, v. 263, n. FEBRUARY, p. 687–689, 1994.

ZHANG, Z.; DOUGHERTY, P. M.; OPPENHEIMER, S. M. Characterization of baroreceptor-related neurons in the monkey insular cortex. 1998.

ZHANG, Z. H.; RASHBA, S.; OPPENHEIMER, S. M. Insular cortex lesions alter baroreceptor sensitivity in the urethane-anesthetized rat. **Brain Research**, v. 813, n. 1, p. 73–81, 1998.

ZHAO, R.; CHEN, H.; SHARP, B. M. Nicotine-induced norepinephrine release in hypothalamic paraventricular nucleus and amygdala is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide in the nucleus tractus solitarius. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, n. 2, p. 837–844, 2007.

ZHOU, L.; ZHU, D. Y. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 223–230, 2009.

ZHOU, Q.-G. et al. Hippocampal Neuronal Nitric Oxide Synthase Mediates the Stress-Related Depressive Behaviors of Glucocorticoids by Downregulating Glucocorticoid Receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 21, p. 7579–7590, 2011.