

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
MARIANNA KAMIYA GOUVEIA

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA NO  
NÚCLEO LEITO DA ESTRIA TERMINAL NAS RESPOSTAS AUTÔNOMAS E  
NEUROENDÓCRINAS DESENCADEADAS PELO ESTRESSE POR RESTRIÇÃO  
AGUDO EM RATOS.**

Araraquara  
2012

MARIANNA KAMIYA GOUVEIA

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA NO  
NÚCLEO LEITO DA ESTRIA TERMINAL NAS RESPOSTAS AUTÔNOMAS E  
NEUROENDÓCRINAS DESENCADEADAS PELO ESTRESSE POR RESTRIÇÃO  
AGUDO EM RATOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em  
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,  
da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de  
Farmacêutica-Bioquímica

**Orientador : Prof. Dr. Carlos César Crestani**

**Co-orientador: Dr. Tarciso Miguel Tadeu**

Araraquara  
2012

MARIANNA KAMIYA GOUVEIA

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA NO  
NÚCLEO LEITO DA ESTRIA TERMINAL NAS RESPOSTAS AUTÔNOMAS E  
NEUROENDÓCRINAS DESENCADEADAS PELO ESTRESSE POR RESTRIÇÃO  
AGUDO EM RATOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em  
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,  
da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de  
Farmacêutica-Bioquímica

**Orientador : Prof. Dr. Carlos César Crestani**

**Co-orientador: Dr. Tarciso Miguel Tadeu**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Carlos César Crestani**  
**Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”**

---

**Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza**  
**Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”**

---

**Rodrigo Molini Leão**  
**Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”**

**Araraquara, 12 de Dezembro de 2012**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor e orientador Carlos César Crestani pela paciência comigo durante todo o estágio de iniciação, sua grande dedicação pelo trabalho que exerce, sendo responsável pelo meu incentivo pessoal a área acadêmica.

Ao meu co-orientador Tarciso Miguel Tadeu pela atenção especial dispendida durante todo esse período para meu aprendizado.

Às técnicas de laboratório Elizabeth Lepera e Rosana Pupim que foram responsáveis por todo meu desenvolvimento dentro de um laboratório.

Aos meus pais Samara Kamiya Barbosa e Marcos Gouveia pelo apoio e suporte durante toda a minha graduação, tornando mais um sonho concreto.

Aos meus amigos e companheiros que durante todos esses anos direta ou indiretamente influenciaram na concepção desse trabalho: Lucas Zangirolami Bonetti, Raíssa Bittar Mastello, Alexandre Ebina, Camila Capel Godinho e Patrícia Higa Nakazone.

## RESUMO

Estudos têm demonstrado a ativação de neurônios no núcleo leito da estria terminal (NLET) durante situações aversivas. Além disso, foi demonstrado o envolvimento do NLET no controle das respostas cardiovasculares e neuroendócrinas durante o estresse. Evidências têm apontado que a neurotransmissão colinérgica, através de receptores muscarínicos, é um mecanismo envolvido no controle das respostas fisiológicas durante o estresse emocional em várias estruturas límbicas. No entanto, apesar de estudos indicarem o envolvimento de mecanismos colinérgicos do NLET no controle da função cardiovascular, não existem evidências na literatura acerca da participação da neurotransmissão colinérgica no NLET nas respostas fisiológicas ao estresse. Diante disso, nosso objetivo no presente estudo foi investigar o efeito do pré-tratamento bilateral do NLET com hemicolínio (inibidor do transportador de colina), metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) ou neostigmina (inibidor da enzima acetilcolinesterase) sobre as respostas autonômicas e neuroendócrinas desencadeadas pelo estresse por restrição agudo em ratos. Para tanto, seis dias antes dos experimentos os animais tiveram cânulas guias implantadas bilateralmente no NLET para administração dos fármacos. Vinte quatro horas antes dos experimentos um cateter de polietileno foi implantado na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares. No dia do experimento, os animais foram submetidos a uma sessão aguda de 30 minutos de estresse por restrição 10 minutos após o tratamento farmacológico do NLET. Medidas de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), temperatura cutânea da cauda e dos níveis plasmáticos de corticosterona foram analisados antes e durante o estresse por restrição em todos os grupos experimentais. O estresse por restrição causou elevação nos valores de PAM, FC e corticosterona plasmática e redução na temperatura cutânea da cauda. A microinjeção de hemicolínio ou metilatropina no NLET aumentou a resposta taquicárdica desencadeada pela restrição, sem interferir com os demais parâmetros investigados. Por outro lado, a facilitação da neurotransmissão colinérgica no NLET através do tratamento local com neostigmina reduziu as

respostas pressora, taquicárdica e de redução da temperatura cutânea da cauda, e estes feitos foram inibidos pelo pré-tratamento com metilatropina. Os dados apresentados no presente sugerem que a neurotransmissão colinérgica no NLET, atuando através da ativação receptores muscarínicos, tem uma ação inibitória sobre a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse por restrição agudo. Os dados também evidenciaram uma influência da ativação de receptores muscarínicos locais nas respostas pressora e de temperatura cutânea da cauda desencadeada pela restrição. As evidências apresentadas no presente estudo também sugerem que a modulação da ativação do eixo HPA pelo NLET é independente de mecanismos colinérgicos locais.

**Palavras- chave:** *Núcleo leito da estria terminal, neurotransmissão colinérgica, estresse, função cardiovascular, atividade neuroendócrina, ratos*

## ABSTRACT

Studies have demonstrated activation of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) during aversive threats. Furthermore, it was demonstrated a BNST involvement in the control of cardiovascular and neuroendocrine responses during stress. Evidences have shown that cholinergic neurotransmission through activation of muscarinic receptors is involved in physiological responses during emotional stress in several limbic structures. However, despite studies indicating the involvement of BNST cholinergic mechanisms in control of cardiovascular function, the role of BNST cholinergic neurotransmission in modulating physiological responses to stress has never been investigated. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of bilateral pretreatment of the BNST with hemicholinium (choline transporter inhibitor), methylatropine (muscarinic cholinergic receptor antagonist) or neostigmine (acetylcholinesterase inhibitor) in autonomic and neuroendocrine responses evoked by acute restraint stress in rats. For this, six days before the experiments animals had cannulae implanted bilaterally in the BNST for administration of drugs. Twenty-four hours before the experiments a polyethylene catheter was implanted in the femoral artery for recording of cardiovascular parameters. On the day of the experiment, the animals were subjected to an acute session of 30 minutes of restraint stress 10 minutes after the pharmacological treatment of the BNST. Measurements of mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), tail skin temperature and plasma levels of corticosterone were analyzed before and during restraint stress in all experimental groups. Acute restraint stress evoked significant increase on MAP, HR and plasma corticosterone levels and decrease on tail cutaneous temperature. Bilateral microinjection of hemicholinium or methylatropine into the BNST enhanced the tachycardiac response to restraint stress without affecting other parameters investigated. On the other hand, facilitation of local cholinergic neurotransmission evoked by BNST treatment with neostigmine decreased the MAP and HR and tail skin temperature responses to restraint, and these effects were abolished after local pretreatment with methylatropine. Our results suggest that BNST cholinergic neurotransmission through activation of local muscarinic

receptor play an inhibitory role in tachycardiac response to acute restraint stress. Present data also indicated an influence of muscarinic receptors activation on blood pressure and tail skin temperature responses evoked by restraint. The evidence presented in this study also suggested that modulation of the HPA axis by the BNST is independent of local cholinergic mechanisms.

**Keywords:** Bed nucleus of the stria terminalis, cholinergic neurotransmission, stress, cardiovascular function, neuroendocrine activity, mice



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. METODOLOGIA.....	11
3.1- Animais .....	11
3.2-Técnica de implante de cânulas guias no NLET .....	12
3.3-Canulação da artéria femoral .....	13
3.4-Registro da pressão arterial e frequência cardíaca .....	13
3.5- Drogas utilizadas .....	14
3.6- Dosagem das concentrações plasmáticas de corticosterona .....	14
3.7- Registro da temperatura cutânea da cauda .....	14
3.8- Estresse por restrição agudo.....	14
3.9-Microinjeção de drogas no NLET.....	14
3.10- Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas .....	15
3.11-Protocolos Experimentais.....	15
3.11.1- Efeito do pré-tratamento do NLET com hemicolínio sobre as respostas neuroendócrinas e autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos. ....	16
3.11.2- Efeito do pré-tratamento do NLET com metilatropina sobre as respostas neuroendócrinas e autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos. ....	16
3.11.3- Efeito do pré-tratamento do NLET com neostigmina e/ou metilatropina sobre as respostas neuroendócrinas e autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.....	16
3.12- Análise estatística.....	17
4. RESULTADOS .....	18
4.1.Efeito do pré-tratamento do NLET com hemicolínio sobre as respostas neuroendócrinas e autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos. ....	18
4.2.Efeito do pré-tratamento do NLET com metilatropina sobre as respostas neuroendócrinas e autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos. ....	21

<i>4.3.- Efeito do pré-tratamento do NLET com neostigmina e/ou metilatropina sobre as respostas neuroendócrinas e autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.</i>	
.....	24
5. DISCUSSÃO.....	28
6.CONCLUSÕES .....	33
REFERENCIAS .....	34

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 .....	19
Figura 2 .....	20
Figura 3 .....	22
Figura 4 .....	23
Figura 5 .....	26
Figura 6 .....	27

## LISTA DE TABELA

Tabela 1.....	25
---------------	----

## 1. INTRODUÇÃO

Todos os indivíduos são, em maior ou menor grau, continuamente expostos a situações de estresse. A sobrevivência de todas as espécies durante situações aversivas requer um adequado e coordenado conjunto de respostas fisiológicas (DAMPNEY, *et al.*, 2008, ULRICH-LAI e HERMAN, 2009). A manutenção da homeostasia durante o estresse depende da ativação coordenada dos sistemas neuroendócrino e autônomo (DAMPNEY, *et al.*, 2008, ULRICH-LAI e HERMAN, 2009). O sistema nervoso autônomo promove a resposta imediata ao estresse, que é caracterizada principalmente por alterações na atividade cardiovascular, que incluem: aumento na pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), redução do fluxo sanguíneo da pele e vísceras, e alteração na atividade do barorreflexo (BARRON e VAN LOON, 1989, DAMPNEY, *et al.*, 2008, BUSNARDO, *et al.*, 2010; CRESTANI *et al.*, 2010). A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) durante o estresse promove aumento no nível plasmático de glicocorticóide, com valores máximos plasmáticos do hormônio observados alguns minutos após o início do estresse (KVETNANSKY, *et al.*, 1979, CHOI, *et al.*, 2007). Apesar da importância das respostas fisiológicas durante situações aversivas, os mecanismos envolvidos com estas respostas ainda são pouco compreendidos.

As respostas fisiológicas durante o estresse emocional são mediadas por estruturas límbicas no sistema nervoso central, através da ação de vários mecanismos neuroquímicos (JOELS e BARAM, 2009, ULRICH-LAI e HERMAN, 2009). O núcleo leito da estria terminal (NLET) é uma estrutura límbica localizada no prosencéfalo rostral, que forma um contínuo rostralmente à amígdala (WELLER & SMITH, 1982). Este núcleo é subdividido neuroatomicamente em anterior e posterior (DONG *et al.*, 2001). Além disso, cerca de 20 subnúcleos foram identificados nas divisões anterior e posterior do NLET (DONG *et al.*, 2001).

O NLET modula respostas comportamentais e fisiológicas (neuroendócrinas e autonômicas) a estímulos aversivos. Este núcleo é conectado com diversas estruturas límbicas, tais como o córtex pré-frontal (CPF), os núcleos central e medial da amígdala, diversas regiões do hipotálamo, o hipocampo, o núcleo parabraquial, a substância cinzenta

periaqueducal, e regiões autonômicas bulbares (DONG et al, 2001; DONG e SWANSON, 2004). Deste modo, tem sido proposto que o NLET é um importante núcleo de integração das respostas fisiológicas e comportamentais, conectando estruturas prosencefálicas, como o CPF, o hipocampo e a amígdala, a núcleos hipotalâmicos e bulbares envolvidos no controle da atividade neuroendócrina e autonômica (ULRICH-LAI e HERMAN, 2009).

Evidências têm apontado que a neurotransmissão colinérgica, através da ativação de receptores colinérgicos muscarínicos, é um importante mecanismo neuroquímico envolvido no controle das respostas fisiológicas durante o estresse emocional em várias estruturas límbicas (RAMADE e BAYLE, 1989, KUBO, *et al.*, 2003, FORTALEZA, *et al.*, 2009). Foram identificados terminais colinérgicos no NLET (RUGGIERO, *et al.*, 1990). A presença de receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos no NLET também foi relatada (WANSLEY et al, 1984; CLARKE et al, 1984). Além disso, estudos eletrofisiológicos demonstraram que a ativação de receptores muscarínicos locais medeiam os efeitos excitatórios da acetilcolina em neurônios do NLET (CASADA e DAFNY, 1993). A microinjeção de acetilcolina ou carbacol, agonista colinérgico, no NLET causou aumento na PA, acompanhado de bradicardia (ALVES, *et al.*, 2007, NASIMI e HATAM, 2011). Além disso, a neurotransmissão colinérgica no NLET modula a atividade do barorreflexo de maneira similar àquela observada durante o estresse (NASIMI e HATAM, 2011). Apesar de estes resultados indicarem o envolvimento de mecanismos colinérgicos do NLET no controle da atividade cardiovascular, e de estudos indicarem que vias colinérgicas no SNC estão envolvidas nas respostas fisiológicas durante o estresse, não existem evidências na literatura da participação da neurotransmissão colinérgica do NLET nas respostas fisiológicas do estresse.

O estresse por restrição é um modelo de estresse não-condicionado e inescapável bem aceito na literatura (BARRON e VAN LOON, 1989, CHOI, *et al.*, 2007), no qual consiste em colocar o animal em um tubo cilíndrico de contenção. Este modelo causa respostas neuroendócrinas e autônomas caracterizadas por elevação nos níveis plasmáticos de glicocorticóides, aumentos da PA e FC, modulação da atividade do barorreflexo

e redução da temperatura cutânea, nas quais são mantidas durante todo o período de estresse (BARRON e VAN LOON, 1989, MCDOUGALL, *et al.*, 2000, CHOI, *et al.*, 2007, CRESTANI, *et al.*, 2010). Diante do exposto acima, o presente estudo tem como hipótese que a neurotransmissão colinérgica no NLET, através da ativação de receptores colinérgicos muscarínicos locais, está envolvida nas respostas cardiovasculares, neuroendócrinas e de alteração de fluxo sanguíneo cutâneo desencadeadas pelo estresse por restrição agudo em ratos.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo geral do presente estudo é investigar o envolvimento da neurotransmissão colinérgica no NLET nas respostas neuroendócrinas e autônomas desencadeadas pelo estresse por restrição agudo em ratos. Para tanto, os objetivos específicos são:

- Investigar o efeito do pré-tratamento do NLET com hemicolínio, inibidor do transportador de colina, ou metilatropina, antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos, sobre as respostas de aumento da PA e FC, redução da temperatura cutânea da cauda e aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona desencadeadas pelo estresse por restrição agudo em ratos;
- Estudar o efeito do pré-tratamento do NLET com neostigmina, inibidor da enzima acetilcolinesterase, e/ou metilatropina sobre as respostas de aumento da PA e FC, redução da temperatura cutânea da cauda e aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona desencadeadas pelo estresse por restrição agudo em ratos.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1- Animais**

Foram utilizados ratos Wistar de peso corporal variando entre 240-270g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da UNESP de Botucatu. Os animais tiveram acesso livre a ração granulada e água e foram submetidos à alternância de luz (12h claro/ 12h escuro). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCF-UNESP (protocolo: CEP/FCF/CAr. 07/2011).

### **3.2-Técnica de implante de cânulas guias no NLET**

Cinco dias antes dos experimentos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (intraperitoneal, 250 mg/kg). Após a tricotomia, a cabeça do rato foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, EUA), e foi realizada assepsia do campo cirúrgico com álcool a 70%. Para redução do sangramento durante a cirurgia, foi injetado 0,3 ml de solução de lidocaína com vasoconstritor (3% de levoarterenol, Harvey Química Farmacêutica Ind. e Comércio Ltda, Catanduva, SP). A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se completamente o periósteo. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada a 10%. Todas as coordenadas terão como referência os parâmetros obtidos do Atlas de Paxinos & Watson (1997), ajustados ao peso corporal do animal (Borges,1999). A interaural foi utilizada como ponto de referência para as coordenadas.

#### **Núcleo Leito da Estria Terminal (NLET)**

Ântero-posterior: +7,7 mm em relação a interaural;

Lateral: + 4 mm a partir do bregma;

Dorso-ventral: -5,8 mm em relação ao osso;

Incisivo = -3,2 mm.

Após o posicionamento da cânula de aço inoxidável, foi feito um orifício no crânio com auxílio de broca odontológica, por onde foi introduzida a cânula constituída por um segmento de agulha hipodérmica (26 x 0,6 mm, 23 gauge), com 13 mm de comprimento. A cânula foi fixada ao crânio com uma resina acrílica autopolimerisável (Simplex, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ) e pequenos parafusos foram previamente implantados na calota craniana. Um mandril com 0,2 mm de diâmetro foi introduzido na cânula, evitando a obstrução da mesma durante o período de recuperação do animal. Como medida profilática, ao final da cirurgia o animal recebeu 0,2 mL de pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via

intramuscular e 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) pela via subcutânea.

### **3.3-Canulação da artéria femoral**

Vinte e quatro horas antes dos experimentos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (intraperitoneal, 250 mg/kg) para implantação de cateteres na artéria femoral. Este vaso foi dissecado e um cateter de polietileno foi introduzido até a artéria aorta abdominal inferior. Os cateteres foram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina), e obstruídos com pino de metal. Após implantação dos cateteres, os mesmos foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica.

O cateter da artéria femoral foi utilizado para registro da pressão arterial e extração de amostras de sangue. O registro da pressão arterial foi realizado pelo menos 24 h após o procedimento cirúrgico para implantação do cateter na artéria femoral, permitindo a recuperação dos animais dos efeitos anestésicos. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro da pressão arterial.

### **3.4-Registro da pressão arterial e frequência cardíaca**

Antes do início dos registros, 0,1 ml de solução salina com heparina (15 U/ml) foi injetada no interior dos cateteres para desobstrução dos mesmos. O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão. A pressão arterial pulsátil foi registrada utilizando um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, Austrália), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30, ML866, ADInstruments, Austrália), usando um programa apropriado (Lab Chart PRO, ADInstruments, Austrália). Os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos a partir dos sinais da pressão arterial pulsátil (PAP).



### **3.5- Drogas utilizadas**

O hemicolínio (inibidor do transportador de colina), a metilatropina (antagonista não-seletivo de receptores colinérgicos), o tribromoetanol e a uretana foram dissolvidos em salina (NaCl 0,9%). O pentabiótico (Fontoura-Wyeth, Brasil) e o anti-inflamatório flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) foram utilizados como fornecido pelos fabricantes.

### **3.6- Dosagem das concentrações plasmáticas de corticosterona**

Dosagem das concentrações plasmáticas de corticosterona foi realizada utilizando a técnica de radioimunoensaio. O sangue (200µL) foi coletado através da cânula implantada na artéria femoral, e processado conforme descrito por Cruz *et al* (2005) (CRUZ, *et al.*, 2005).

### **3.7- Registro da temperatura cutânea da cauda**

A temperatura cutânea foi mensurada na porção inicial da cauda dos animais utilizando um termômetro infravermelho (MiniTemp MT4, Raytek, EUA). Uma marca foi feita na cauda para padronizar as medidas, e a distância do termômetro para a marca foi mantida constante usando uma régua de 8 cm fixada na ponta do termômetro.

### **3.8- Estresse por restrição agudo**

O estresse por restrição agudo consiste na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos (diâmetro=6,5 cm, comprimento=15 cm, ventilados por buracos de ½ polegada que preencham aproximadamente 20% do tubo), por um período de 30 min (CHOI, *et al.*, 2007, CRESTANI, *et al.*, 2010). Cada animal foi submetido a apenas uma sessão de restrição para evitar habituação.

### **3.9-Microinjeção de drogas no NLET**

As drogas administradas foram dissolvidas em salina (NaCl 0,9%). As agulhas injetoras (33 G, Small Parts, EUA) que foram utilizadas para

microinjeção das drogas no SNC são um mm mais longa do que as cânulas guias fixada ao crânio, e foram conectadas a uma seringa de 2  $\mu$ l (Hamilton, EUA). As drogas foram injetadas no volume de 100nL.

### **3.10- Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas**

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, intraperitoneal). Foi injetado o corante azul de Evan a 1% no local da microinjeção da droga. Em seguida, os ratos foram submetidos à abertura da caixa torácica para exposição do coração. Para facilitar a perfusão cerebral, a aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática. Uma incisão foi feita na aurícula direita para o escoamento do sangue e do perfusado, e uma agulha para perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo. A perfusão foi realizada inicialmente com 20 mL de solução fisiológica de NaCl 0,9%, seguida por 20 mL de solução tamponada de formalina 10%.

Posteriormente, os cérebros foram retirados da caixa craniana e pós-fixados na respectiva solução de perfusão. Os cérebros foram seccionados com o auxílio de um criostato. Foram feitas várias secções da região do NLET e o posicionamento dos sítios de injeção foram analisados utilizando-se o Atlas de Paxinos e Watson (1997) como referência.

### **3.11-Protocolos Experimentais**

Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotóxica para implantação de cânula guia direcionada ao NLET, e mantidos em recuperação por quatro dias. O experimento foi realizado 24 h após a implantação de um cateter na artéria femoral. Os animais foram mantidos em caixas individuais na sala de experimentação por ao menos 30 minutos antes do experimento, para habituação às condições de som e iluminação da sala. Após este período, foi iniciado o registro dos parâmetros cardiovasculares. Um registro de pelo menos 30 minutos foi realizado para determinação dos valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca.

**3.11.1- Efeito do pré-tratamento do NLET com hemicolínio sobre as respostas neuroendócrinas e autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.**

Grupos diferentes de animais receberam microinjeção bilateral no NLET de veículo (salina) (100 nL, n=7) ou hemicolínio (inibidor do transportador de colina) (3 nmol/100nL, n=8). A dose de hemicolínio foi baseada em estudos anteriores do nosso grupo (CRESTANI, *et al.*, 2009, FORTALEZA, *et al.*, 2009). Quinze minutos após, os animais foram submetidos ao estresse por restrição agudo. A PA e FC foram registradas durante todo o período de restrição. A temperatura cutânea da cauda foi medida aos 10, 5 e 0 min antes da restrição, e a cada 5 min durante a restrição. Amostras de sangue para dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona foram obtidas da artéria femoral imediatamente antes da restrição e a cada 15 min após o início do estresse.

**3.11.2- Efeito do pré-tratamento do NLET com metilatropina sobre as respostas neuroendócrinas e autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.**

Grupos diferentes de animais receberam microinjeção bilateral no NLET de veículo (salina) (100 nL, n=6) ou metilatropina (antagonista de receptores muscarínicos) (3nmol/100nL, n=6). A dose de metilatropina foi baseada em estudos anteriores do nosso grupo (CRESTANI, *et al.*, 2009, FORTALEZA, *et al.*, 2009). Quinze minutos após, os animais foram submetidos ao estresse por restrição agudo. As medidas cardiovasculares e de temperatura cutânea da cauda, bem como a coleta das amostras de sangue para dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona foram realizadas como no protocolo anterior (ver item 3.9.1).

**3.11.3- Efeito do pré-tratamento do NLET com neostigmina e/ou metilatropina sobre as respostas neuroendócrinas e autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.**

Neste experimento, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

- 1) veículo (salina, 100nL)+veículo (salina, 100nL) (n=6)
- 2) veículo + neostigmina (0,1nmol/100nL) (n=6)
- 3) atropina (3nmol/100nL) + veículo (n=8)
- 4) atropina+neostigmina (n=6)

As doses dos fármacos foram baseadas em estudos anteriores do nosso grupo (FERNANDES, *et al.*, 2005, FORTALEZA, *et al.*, 2009). Todos os tratamentos foram realizados unilateralmente no NLET, e os animais receberam o segundo tratamento cinco minutos após o primeiro tratamento. Cinco minutos após o segundo tratamento, os ratos foram submetidos ao estresse por restrição agudo. As medidas cardiovasculares e de temperatura cutânea da cauda, bem como a coleta das amostras de sangue para dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona foram realizadas como descrito acima (ver item 3.9.1).

### **3.12- Análise estatística**

Os dados foram expressos como média±erro padrão da média (EPM). O efeito do tratamento do NLET com hemicolinio e metilatropina sobre os valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda foram comparados utilizando teste t de *Student*. Os parâmetros basais dos animais tratados com metilatropina e/ou neostigmina foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA) monofatorial. A ANOVA bifatorial (tratamento vs tempo), com tratamento como medida principal e tempo como medida repetida, foi usada para comparar as curvas temporais de variações da PAM, FC, temperatura cutânea da cauda e corticosterona plasmática durante o estresse por restrição agudo.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Efeito do pré-tratamento do NLET com hemicolínio sobre as respostas neuroendócrinas e autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.**

O tratamento bilateral do NLET com hemicolínio (3nmol/100nL), inibidor do transportador de colina, não afetou os parâmetros basais de PAM ( $102 \pm 1$  vs  $101 \pm 2$  mmHg;  $t = 0,3$ ,  $P > 0.05$ ), FC ( $350 \pm 5$  vs  $357 \pm 3$  bpm;  $t = 1,2$ ,  $P > 0.05$ ), temperatura cutânea da cauda ( $29.0 \pm 0.5$  vs  $28.3 \pm 0.7$  °C;  $t = 0,3$ ,  $P > 0.05$ ) e corticosterona plasmática ( $16 \pm 4$  vs  $18 \pm 3$  µg/dl;  $t = 0,5$ ,  $P > 0.05$ ). Entretanto, o estresse por restrição agudo causou um aumento da PAM ( $F_{(17,234)} = 42$ ,  $P < 0.0001$ ), FC ( $F_{(17,234)} = 43$ ,  $P < 0.0001$ ), dos níveis plasmáticos de corticosterona ( $F_{(2,39)} = 24$ ,  $P < 0.0001$ ) e uma redução da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(8,117)} = 18$ ,  $P < 0.0001$ ) (Figura 1). Além disso, o tratamento do NLET com hemicolínio aumentou a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse por restrição ( $F_{(1,234)} = 90$ ,  $P < 0.0001$ ), porém a análise estatística não encontrou interação entre os fatores tempo e tratamento ( $F_{(17,234)} = 2$ ,  $P > 0.05$ ) (Figura 1). As respostas de aumento da PAM ( $F_{(1,234)} = 1$ ,  $P > 0.05$ ), elevação da corticosterona plasmática ( $F_{(1,39)} = 1$ ,  $P > 0.05$ ) e de redução da temperatura da cauda ( $F_{(1,117)} = 1$ ,  $P > 0.05$ ) não foram afetadas pela depleção dos estoques de acetilcolina no NLET (Figura 1). Representação diagramática dos sítios de injeção no NLET de todos os animais utilizados neste protocolo é apresentado na Figura 2.

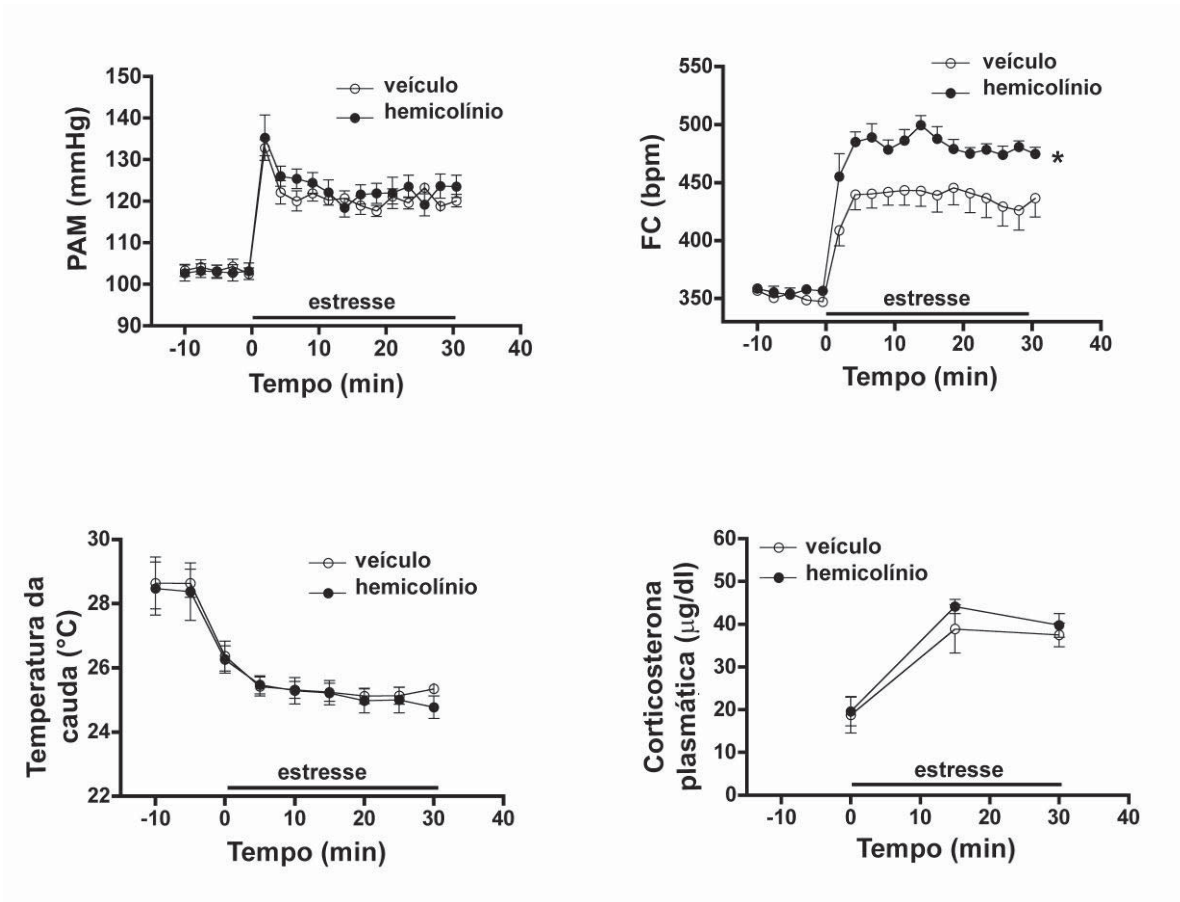


Figura 1

Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), temperatura da cauda e concentração plasmática de corticosterona durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no NLET com veículo (salina, 100nL) ou hemicolinio (3 nmol/100nL), inibidor do transportador da colina, no NLET. O início do estresse foi no t=0. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). Asterisco indica efeito significativo do tratamento sobre a resposta durante todo o período de exposição ao estresse por restrição agudo ( $P < 0.05$ , AVOVA).

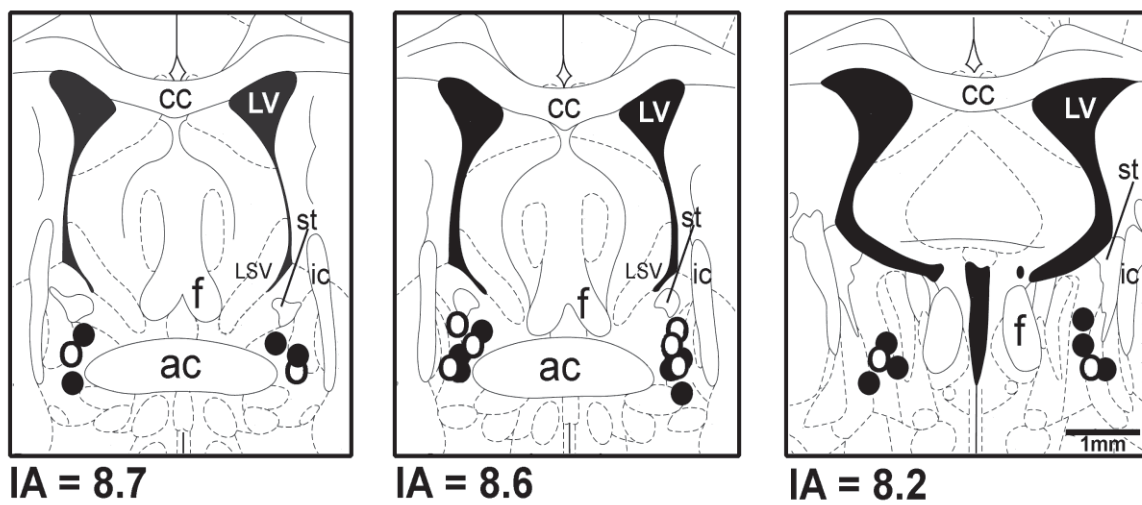


Figura 2

Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET de veículo (círculos brancos) e hemicolíneo (círculos pretos).

**4.2.Efeito do pré-tratamento do NLET com metilatropina sobre as respostas neuroendócrinas e autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.**

O tratamento bilateral do NLET com metilatropina (3nmol/100nL, n=6), antagonista não-seletivo de receptores colinérgicos muscarínicos, não afetou os parâmetros basais de PAM ( $103\pm 2$  vs  $100\pm 2$  mmHg;  $t= 0,8$ ,  $P>0.05$ ), FC ( $351\pm 5$  vs  $359\pm 8$  bpm;  $t= 0,7$ ,  $P>0.05$ ), temperatura cutânea da cauda ( $28.3\pm 0.3$  vs  $28.9\pm 0.8$  °C;  $t= 0,5$ ,  $P>0.05$ ) e corticosterona plasmática ( $17\pm 2$  vs  $20\pm 2$  µg/dl;  $t= 1,4$ ,  $P>0.05$ ). Entretanto, o estresse por restrição agudo causou um aumento da PAM ( $F_{(17,180)}=24$ ,  $P<0.0001$ ), FC ( $F_{(17,180)}=18$ ,  $P<0.0001$ ), dos níveis plasmáticos de corticosterona ( $F_{(2,30)}=30$ ,  $P<0.0001$ ) e uma redução da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(8,90)}=15$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 3). Além disso, o tratamento do NLET com metilatropina aumentou a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse por restrição ( $F_{(1,180)}=54$ ,  $P<0.0001$ ), porém a ANOVA bifatorial não indicou interação entre os fatores tempo e tratamento ( $F_{(17,180)}=2$ ,  $P>0.05$ ) (Figura 3). As respostas de aumento da PAM ( $F_{(1,180)}=1$ ,  $P>0.05$ ), elevação da corticosterona plasmática ( $F_{(1,30)}=1$ ,  $P>0.05$ ) e de redução da temperatura da cauda ( $F_{(1,90)}=1$ ,  $P>0.05$ ) não foram afetadas pela depleção dos estoques de acetilcolina no NLET (Figura 3). Representação diagramática dos sítios de injeção no NLET de todos os animais utilizados neste protocolo é apresentado na Figura 4.



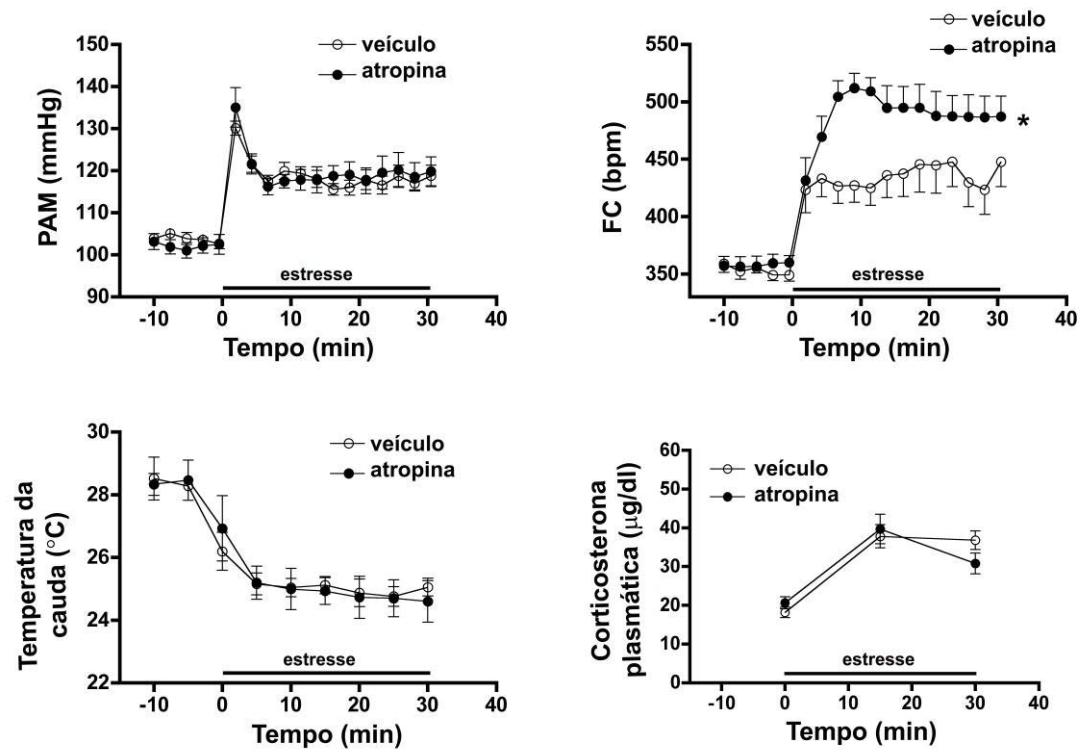


Figura 3

Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), temperatura da cauda e concentração plasmática de corticosterona durante o estresse por restrição agudo em animais tratados bilateralmente no NLET com veículo (salina, 100nL) ou metilatropina (3 nmol/100nL), antagonista não-seletivo de receptores colinérgicos muscarínicos, no NLET. O início do estresse foi no t=0. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). Asterisco indica efeito significativo do tratamento sobre a resposta durante todo o período de exposição ao estresse por restrição agudo ( $P < 0.05$ , AVOVA).

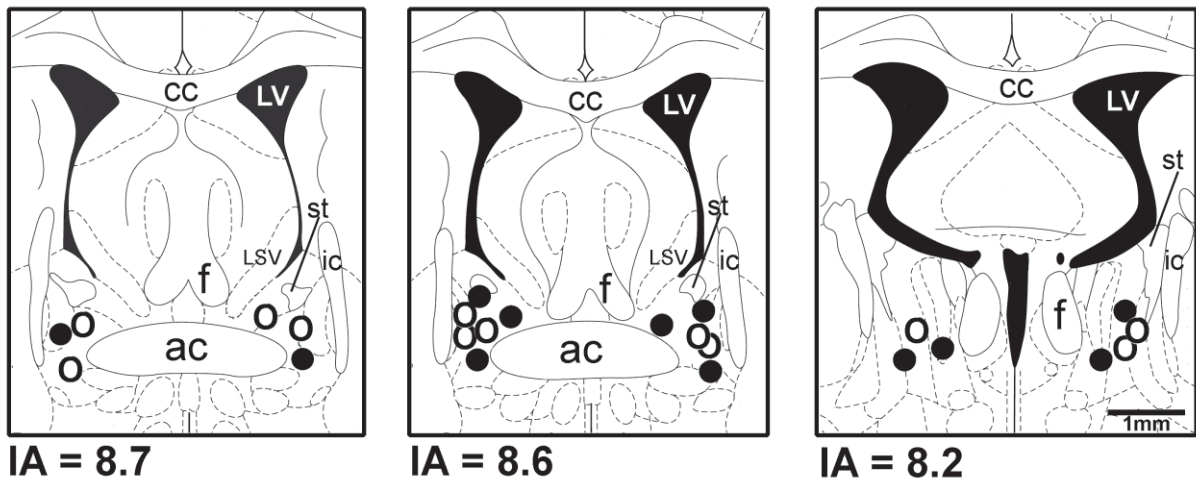


Figura 4

Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET de veículo (círculos brancos) e metilatropina (círculos pretos).

#### **4.3.- Efeito do pré-tratamento do NLET com neostigmina e/ou metilatropina sobre as respostas neuroendócrinas e autônomas ao estresse por restrição agudo em ratos.**

O tratamento unilateral do NLET com metilatropina (3nmol/100nL) e/ou neostigmina (0,1 nmol/100nL), inibidor da enzima acetilcolinesterase, não afetou os parâmetros basais PAM, FC, temperatura cutânea da cauda e corticosterona plasmática (Tabela 1). Entretanto, o estresse por restrição agudo causou um aumento da PAM ( $F_{(17,396)}=33$ ,  $P<0.0001$ ), FC ( $F_{(17,396)}=56$ ,  $P<0.0001$ ), dos níveis plasmáticos de corticosterona ( $F_{(2,66)}=51$ ,  $P<0.0001$ ) e uma redução da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(8,198)}=39$ ,  $P<0.0001$ ) (Figura 5). Além disso, o tratamento do NLET com veículo+neostigmina reduziu as respostas de aumento da PAM ( $F_{(3,396)}=22$ ,  $P<0.0001$ ) e FC ( $F_{(3,396)}=85$ ,  $P<0.0001$ ) e de redução da temperatura cutânea ( $F_{(3,198)}=9$ ,  $P<0.0001$ ) desencadeadas pelo estresse por restrição (Figura 5). A ANOVA bifatorial também indicou interação entre os fatores tempo e tratamento para a FC ( $F_{(51,396)}=1,7$ ,  $P>0.004$ ), mas não para a PAM ( $F_{(51,396)}=0,6$ ,  $P>0.05$ ) e temperatura da cauda ( $F_{(24,198)}=0,8$ ,  $P>0.05$ ). O tratamento unilateral do NLET com metilatropina+veículo não afetou nenhuma das respostas avaliadas (PAM:  $P>0.05$ , FC:  $P>0.05$ , temperatura da cauda:  $P>0.05$ , corticosterona plasmática:  $P>0.05$ ) (Figura 5). Entretanto, os efeitos da neostigmina sobre a PAM ( $P>0.05$ ), FC ( $P>0.05$ ) e temperatura da cauda ( $P>0.05$ ) foram inibidos pelo pré-tratamento local do NLET com metilatropina (Figura 5). Nenhum dos tratamentos farmacológicos afetaram a resposta de aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona induzido pelo estresse por restrição ( $F_{(3,66)}=0,3$ ,  $P>0.05$ ) (Figura 5). Representação diagramática dos sítios de injeção no NLET de todos os animais utilizados neste protocolo é apresentado na Figura 6.

**Tabela 1**

Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca, temperatura cutânea da cauda e concentração plasmática de corticosterona em animais tratados unilateralmente no NLET com veículo+veículo, metilatropina+veículo, veículo+neostigmina e metilatropina+neostigmina.

<b>Grupo</b>	<b>PAM (mmHg)</b>	<b>FC (bpm)</b>	<b>Temperatura cutânea cauda (°C)</b>	<b>Corticosterona Plasmática (µg/dl)</b>
veículo+veículo	99±3	354±6	28,5±0,5	22±3
veículo+ atropina	101±3	366±8	29,0±0,4	21±2
atropina+neostigmina	100±1	353±4	28,2±0,6	18±2
veículo+neostigmina	99±2	363±6	28,2±0,5	20±5
	<i>F=0,2</i>	<i>F=0,2</i>	<i>F=0,6</i>	<i>F=0,4</i>

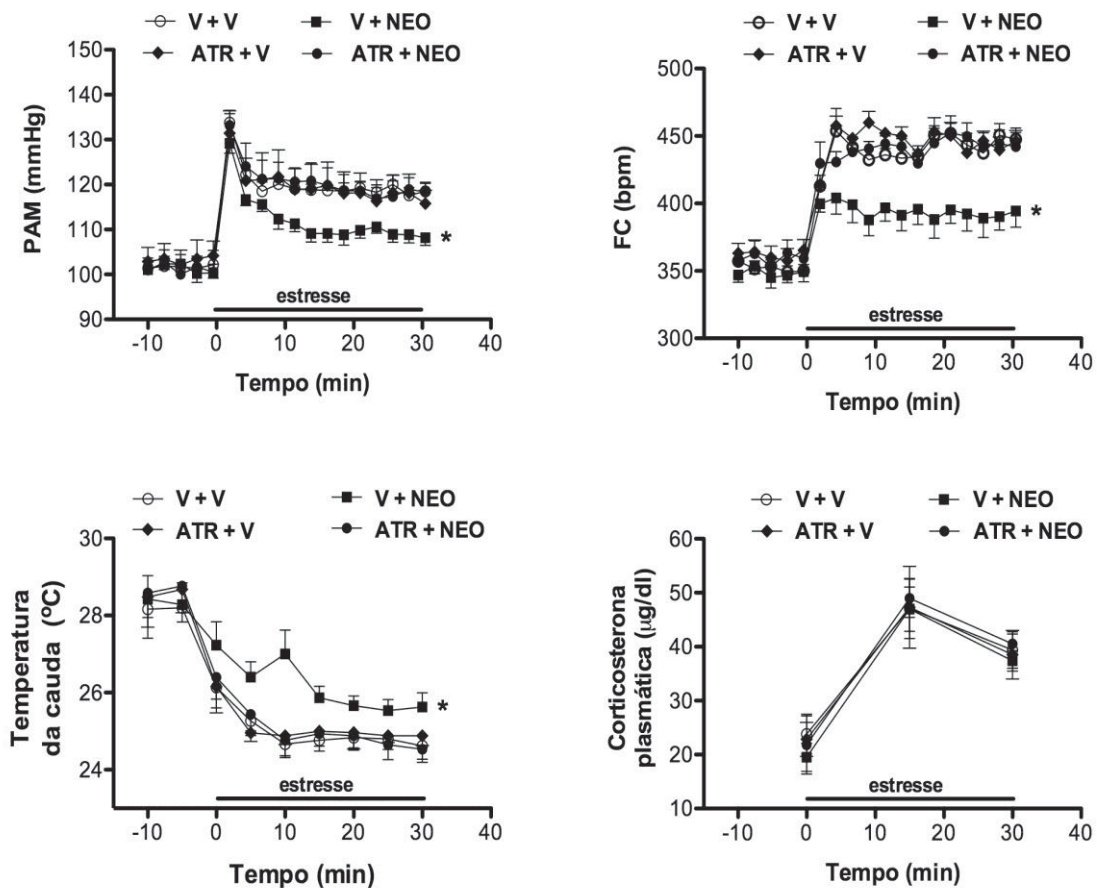


Figura 5

Curvas temporais de variação da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), temperatura da cauda e concentração plasmática de corticosterona durante o estresse por restrição aguda em animais tratados unilateralmente no NLET com veículo+veículo (V + V), metilatropina+veículo (ATR + V), veículo+neostigmina (V + NEO) e metilatropina+neostigmina (ATR + NEO). O início do estresse foi no t=0. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM). Asterisco indica efeito significativo do tratamento sobre a resposta durante todo o período de exposição ao estresse por restrição aguda ( $P < 0.05$ , ANOVA).

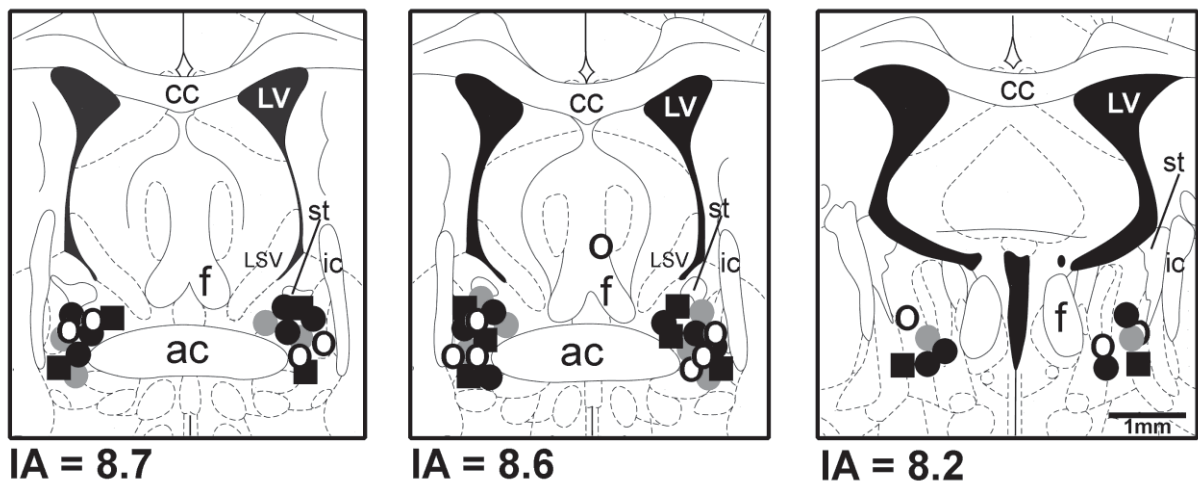


Figura 6

Representação diagramática de cortes coronais do encéfalo de ratos baseado no atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no NLET dos animais do grupo veículo+veículo (círculos brancos), metilatropina+veículo (círculos cinzas), veículo+neostigmina (círculos pretos) e metilatropina+neostigmina (quadrados pretos).

## **5. DISCUSSÃO**

O estresse por restrição é um estímulo aversivo inevitável e não-condicionado conhecido por provocar alterações autonômicas (por exemplo: elevação da PA e FC, redistribuição do fluxo sanguíneo e modulação da atividade barorreflexa), neuroendócrinas (por exemplo: ativação do eixo HPA) e comportamentais (BARRON e VAN LOON 1989; IRVINE *et al.* 1997; MCDUGALL *et al.* 2000; CHOI *et al.* 2007; CRESTANI *et al.* 2010; REIS *et al.* 2011). Deste modo, como esperado, nós observamos que uma sessão aguda de contensão causou elevação da PA, da FC e dos níveis plasmáticos de corticosterona e reduziu a temperatura cutânea da cauda. Diversos estudos tem demonstrado que núcleos diretamente conectados com o NLET, tais como o córtex pré-frontal medial (CPFM), a amígdala e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), estão envolvidos nas respostas fisiológicas desencadeadas pelo estresse por restrição (TAVARES e CORREA 2006; SALOMÉ *et al.*, 2007; BUSNARDO *et al.* 2010). Neste sentido, nosso grupo reportou em um estudo publicado recentemente que o bloqueio não-seletivo de sinapses no NLET facilitou a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse por restrição, sem interferir com a resposta pressora (CRESTANI *et al.* 2009). Foi também demonstrado que a lesão da região anterior do NLET reduziu a ativação do eixo HPA, ao passo que a lesão da porção posterior deste núcleo aumentou a resposta de ACTH e corticosterona plasmática induzida pela restrição (CHOI *et al.* 2007). Estes resultados forneceram evidências iniciais de um envolvimento do NLET nas respostas autonômicas e neuroendócrinas ao estresse. Entretanto, os possíveis neurotransmissores locais envolvidos neste controle ainda não foram completamente elucidados.

Para testar a hipótese de uma participação da neurotransmissão colinérgica do NLET na modulação das respostas fisiológicas ao estresse, nós inicialmente microinjetamos hemicolínio bilateralmente no NLET antes da exposição dos ratos ao tubos de contenção, com o intuito de depletar os estoques de acetilcolina locais. O tratamento com hemicolínio aumentou a resposta taquicárdica ao estresse por restrição, sem interferir com as respostas de PA, temperatura da cauda e corticosterona plasmática. Para investigar se a influência da neurotransmissão colinérgica do NLET nas respostas fisiológicas ao estresse eram mediadas pela ativação de receptores colinérgicos muscarínicos, nós administramos metilatropina localmente no NLET. Assim como observado após tratamento com hemicolínio, a administração de metilatropina no NLET aumentou a resposta taquicárdica ao estresse por restrição, sem interferir com os demais parâmetros investigados. Os efeitos sobre as respostas cardiovasculares ao estresse causados pelo bloqueio de mecanismos colinérgicos foram similares àqueles observados anteriormente após o bloqueio não-seletivo de sinapses no NLET (CRESTANI *et al*, 2009). Deste modo, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que sinapses colinérgicas, através da ativação de receptores muscarínicos locais, medeiam a influência inibitória do NLET sobre a resposta taquicárdica ao estresse por restrição.

Para reforçar a ideia de um envolvimento da neurotransmissão colinérgica do NLET nas respostas fisiológicas ao estresse, nós investigamos o efeito da facilitação colinérgica no NLET através do tratamento local com neostigmina. De maneira inesperada, nós observamos que um aumento dos



níveis de acetilcolina no NLET pelo bloqueio local da enzima acetilcolinesterase reduziu não só a resposta de FC, mas também as alterações na PA e temperatura cutânea induzidas pela restrição. Todos os efeitos da neostigmina foram bloqueados pelo pré-tratamento do NLET com metilatropina. Estes dados reafirmam as evidências de um papel inibitório da neurotransmissão colinérgica do NLET, atuando através de receptores muscarínicos locais, na resposta cardíaca ao estresse. Além disso, os resultados obtidos nos animais tratados com neostigmina também indicaram que mecanismos colinérgicos no NLET podem modular as respostas de PA e temperatura cutânea induzidas pelo estresse. A facilitação da atividade colinérgica no NLET não afetou a resposta de corticosterona plasmática induzida pelo estresse por restrição. Diante disso, apesar de diversos estudos demonstrarem um importante papel do NLET nos mecanismos neurobiológicos envolvidos na ativação do eixo HPA durante o estresse (ULRICH-LAI e HERMAN, 2009), nossos resultados sugerem que este efeito não é mediado pela ação de mecanismos colinérgicos locais.

Os componentes simpático e parassimpático do sistema nervoso autônomo estão envolvidos nos ajustes cardiovasculares durante o estresse. O bloqueio do sistema parassimpático revelou uma importante função inibitória da atividade vagal na resposta cardíaca ao estresse, ao passo que o bloqueio simpático inibe os ajustes vasculares e cardíacos durante o estresse (BERNSTON *et al*, 1991; BAUDRIE *et al*, 1997; CARRIVE *et al*, 2006). O NLET envia projeções diretas para estruturas bulbares envolvidos no controle da atividade autonômica, assim como o núcleo do trato solitário, o núcleo ambíguo

a região ventrolateral do bulbo (GRAY e MAGNUSON, 1987; DONG e SWANSON, 2004). Foi demonstrado que a estimulação do NLET causa redução na PA e FC (CIRIELLO e JANSSEN, 1993; HATAM e NASIMI, 2007). Estes efeitos são mediados por uma inibição da atividade simpática vascular e cardíaca (CIRIELLO e JANSSEN, 1993), através de um mecanismo que envolve a ativação de neurônios no bulbo ventrolateral caudal (BVLC) (GIANCOLA et al, 1993). Neurônios no BVLC inibem a atividade de neurônios pré-motores simpáticos localizados no bulbo ventrolateral rostral, assim diminuindo a atividade de simpática (SVED *et al*, 2000). Além disso, foi observado que a administração de um antagonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_1$  no NLET facilitou a resposta taquicárdica ao estresse por restrição, e este efeito foi inibido após o tratamento sistêmico com um bloqueador da atividade vagal cardíaca (CRESTANI *et al*, 2009). Estes resultados sugeriram que a ativação de adrenoceptores  $\alpha_1$  no NLET tem uma influência inibitória sobre a resposta cardíaca ao estresse, na qual é mediada por uma facilitação da atividade parassimpática. Diante disso, receptores muscarínicos no NLET podem modular as respostas cardiovasculares ao estresse por restrição através de uma facilitação de vias estimulatórias da atividade vagal e/ou através da ativação de vias inibitórias para neurônios simpáticos bulbares.

Tem sido demonstrado que a atividade do barorreflexo é modulada durante situações aversivas (NOSAKA, 1996; CRESTANI *et al*, 2010). Esta modulação é caracterizada por uma facilitação da resposta taquicárdica do barorreflexo e redução da resposta de bradicardia reflexa (CRESTANI *et al*, 2010). Resultados anteriores do nosso grupo indicaram que o NLET modula o

a resposta bradicárdica do barorreflexo de um modo semelhante àquele observado durante o estresse (CRESTANI *et al.*, 2006). Além disso, um estudo recente demonstrou que a microinjeção de acetilcolina no NLET diminuiu a resposta bradicárdica do barorreflexo (NASIMI e HATAM, 2011). Estes dados sugerem que mecanismos colinérgicos no NLET poderiam ter uma função facilitatória nas respostas cardiovasculares ao estresse através de uma modulação da atividade barorreflexa. Entretanto, os resultados do presente estudo evidenciaram que a ativação de receptores muscarínicos no NLET tem uma ação inibitória nas respostas autonômicas ao estresse. Deste modo, estes dados sugerem que mecanismos colinérgicos no NLET modulam as respostas cardiovasculares ao estresse por restrição através de mecanismos independentes de uma modulação da atividade barorreflexa.

O tratamento bilateral do NLET com hemicolinio ou metilatropina não afetou os parâmetros basais da função cardiovascular e neuroendócrina. Estes dados corroboram com estudos anteriores indicando que apesar do NLET desempenhar um importante papel nos mecanismos neurobiológicos envolvidos nas respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse, este núcleo não está envolvido na manutenção tônica da atividade cardiovascular (CRESTANI *et al.*, 2009; HOTT *et al.*, 2012). Além disso, a influência tônica do NLET na manutenção do eixo HPA (HERMAN *et al.*, 1994) parece ser independente de mecanismos colinérgicos locais.

## **6.CONCLUSÕES**

Os nossos resultados indicam que a neurotransmissão colinérgica no NLET tem uma ação inibitória sobre a resposta taquicárdica desencadeada pelo estresse por restrição agudo, através de um mecanismo dependente da ativação de receptores colinérgicos muscarínicos locais. Os dados também evidenciaram uma influência da ativação de receptores muscarínicos locais nas respostas de PA e temperatura cutânea da cauda desencadeada pela restrição. As evidências apresentados no presente estudo também sugerem que modulação da ativação do eixo HPA pelo NLET é independente de mecanismos colinérgicos locais.

## **REFERENCIAS**

ALVES, F.H.; CRESTANI, C.C.; RESSTEL, L.B. e CORREA, F.M. Cardiovascular effects of carbachol microinjected into the bed nucleus of the stria terminalis of the rat brain. **Brain Res**, v.1143, Apr 27, p.161-8. 2007.

BARRON, B.A. e VAN LOON, G.R. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. **J Auton Nerv Syst**, v.28, n.2, Nov, p.179-87. 1989.

BAUDRIE, V.; TULEN, J. H.; BLANC, J.; ELGHOZI, J. L. Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. **J Auton Pharmacol**, v. 17, n. 5, p. 303-9, 1997.

BERNTSON, G. G.; SARTER, M.; CACIOPPO, J. T. Anxiety and cardiovascular reactivity: the basal forebrain cholinergic link. **Behav Brain Res**, v. 94, n. 2, p. 225-48, 1998.

BUSNARDO, C.; TAVARES, R.F.; RESSTEL, L.B.; ELIAS, L.L. e CORREA, F.M. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. **Auton Neurosci**, v.158, n.1-2, Dec 8, p.51-7. 2010.

CARRIVE, P. Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 12, p. 1251-4, 2006.

CASADA, J.H. e DAFNY, N. Muscarinic receptors mediate the effect of acetylcholine (ACh) on neurons of the bed nucleus of the stria terminalis (BNST). **Brain Res**, v.631, n.1, Dec 17, p.124-8. 1993.

CHOI, D.C.; FURAY, A.R.; EVANSON, N.K.; OSTRANDER, M.M.; ULRICH-LAI, Y.M. e HERMAN, J.P. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. **J Neurosci**, v.27, n.8, Feb 21, p.2025-34. 2007.

CIRIELLO, J.; JANSSEN, S.A. Effect of glutamate stimulation of bed nucleus of the stria terminalis on arterial pressure and heart rate. **Am J Physiol.**, v.265, n.5 Pt 2, p.H1516-22, 1993.

CLARKE, P. B.; SCHWARTZ, R. D.; PAUL, S. M.; PERT, C. B.; PERT, A. Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of [3H]acetylcholine, [3H]nicotine, and [125I]-alpha-bungarotoxin. **J Neurosci**, v. 5, n. 5, p. 1307-15, 1985.

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H.; RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. The bed

nucleus of the stria terminalis modulates baroreflex in rats. **Neuroreport**, v. 17, n. 14, p. 1531-5, 2006.

CRESTANI, C.C.; ALVES, F.H.; TAVARES, R.F. e CORREA, F.M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress**, v.12, n.3, p.268-78. 2009.

CRESTANI, C.C.; TAVARES, R.F.; ALVES, F.H.; RESSTEL, L.B. e CORREA, F.M. Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. **Stress**, v.13, n.1, p.61-72. 2010.

CRUZ, F.C.; DELUCIA, R. e PLANETA, C.S. Differential behavioral and neuroendocrine effects of repeated nicotine in adolescent and adult rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v.80, n.3, Mar, p.411-7. 2005.

CULLINAN, W.E.; HERMAN, J.P.; BATTAGLIA, D.F.; AKIL, H. e WATSON, S.J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. **Neuroscience**, v.64, n.2, Jan, p.477-505. 1995.

DAMPNEY, R.A.; HORIUCHI, J. e MCDOWALL, L.M. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. **Auton Neurosci**, v.142, n.1-2, Nov 3, p.3-10. 2008.

DONG, H.W.; PETROVICH, G.D.; SWANSON, L.W. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 38, n. 1-2, p. 192-246, 2001.

DONG, H.W.; SWANSON, L.W. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. **J Comp Neurol**, v.468, p.277-298, 2004.

FERNANDES, K.B.; TAVARES, R.F. e CORREA, F.M. The lateral septal area is involved in the pressor pathway activated by microinjection of norepinephrine into the rat brain cingulate cortex. **Neuropharmacology**, v.49, n.4, Sep, p.564-71. 2005.

FORTALEZA, E.A.; TAVARES, R.F. e CORREA, F.M. The medial amygdaloid nucleus modulates cardiovascular responses to acute restraint in rats. **Neuroscience**, v.159, n.2, Mar 17, p.717-26. 2009.

GIANCOLA, S.B.; RODER, S.; CIRIELLO, J. Contribution of caudal ventrolateral medulla to the cardiovascular responses elicited by activation of bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Res.**, v.606, n.1, p.162-6, 1993.

Gray, T.S.; Magnuson, D.J. Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. **J Comp Neurol**, v.262, p.365–374, 1987.

HATAM, M.; NASIMI, A. Glutamatergic systems in the bed nucleus of the stria terminalis, effects on cardiovascular system. **Exp Brain Res.**, v.178, n.3, p.394-401, 2007.

HERMAN, J.P.; CULLINAN, W.E.; WATSON, S.J. Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. **J Neuroendocrinol.**, v.6, n.4, p.433-42, 1994.

IRVINE, R. J.; WHITE, J.; CHAN, R. The influence of restraint on blood pressure in the rat. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 38, n. 3, p. 157-62, 1997.

JOELS, M. e BARAM, T.Z. The neuro-symphony of stress. **Nat Rev Neurosci**, v.10, n.6, Jun, p.459-66. 2009.

KUBO, T.; OKATANI, H.; KANAYA, T.; HAGIWARA, Y.; FUKUMORI, R. e GOSHIMA, Y. Cholinergic mechanism in the lateral septal area is involved in the stress-induced blood pressure increase in rats. **Brain Res Bull**, v.59, n.5, Jan 30, p.359-64. 2003.

KVETNANSKY, R.; MCCARTY, R.; THOA, N.B.; LAKE, C.R. e KOPIN, I.J. Sympatho-adrenal responses of spontaneously hypertensive rats to immobilization stress. **Am J Physiol**, v.236, n.3, Mar, p.H457-62. 1979.

MCDOUGALL, S.J.; PAULL, J.R.; WIDDOP, R.E. e LAWRENCE, A.J. Restraint stress : differential cardiovascular responses in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.35, n.1 Pt 1, Jan, p.126-9. 2000.

NASIMI, A.; HATAM, M. The role of the cholinergic system of the bed nucleus of the stria terminalis on the cardiovascular responses and the baroreflex modulation in rats. **Brain Res**, v. 1386, p. 81-8, 2011.

NOSAKA, S. Modifications of arterial baroreflexes: obligatory roles in cardiovascular regulation in stress and poststress recovery. **Jpn J Physiol**, v. 46, n. 4, p. 271-88, 1996.

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

RAMADE, F. e BAYLE, J.D. Adaptation of the adrenocorticotrophic response to chronic intermittent stress was altered by intracerebroventricular infusion of hemicholinium-3. **Neuroendocrinology**, v.50, n.2, Aug, p.165-9. 1989.

Reis, D.G.; Scopinho, A.A.; Guimarães, F.S.; Corrêa, F.M.; Resstel, L.B. Behavioral and autonomic responses to acute restraint stress are segregated within the lateral septal area of rats. **PLoS One**, v. 6, n.8, p. e23171.

RESSTEL, L.B.; ALVES, F.H.; REIS, D.G.; CRESTANI, C.C.; CORREA, F.M. e GUIMARAES, F.S. Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. **Neuroscience**, v.154, n.3, Jun 26, p.869-76. 2008.

RUGGIERO, D.A.; GIULIANO, R.; ANWAR, M.; STORNETTA, R. e REIS, D.J. Anatomical substrates of cholinergic-autonomic regulation in the rat. **J Comp Neurol**, v.292, n.1, Feb 1, p.1-53. 1990.

Salomé, N.; Ngampramuan, S.; Nalivaiko, E. Intra-amygdala injection of GABAA agonist, muscimol, reduces tachycardia and modifies cardiac sympatho-vagal balance during restraint stress in rats. **Neuroscience.**, v.148, n.2, p.335-41, 2007.

SVED, A. F.; ITO, S.; MADDEN, C. J. Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation. **Brain Res Bull**, v. 51, n. 2, p. 129-33, 2000.

ULRICH-LAI, Y.M. e HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci**, v.10, n.6, Jun, p.397-409. 2009.

VIANNA, D.M. e CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. **Eur J Neurosci**, v.21, n.9, May, p.2505-12. 2005.

WAMSLEY, J. K.; ZARBIN, M. A.; KUCHAR, M. J. Distribution of muscarinic cholinergic high and low affinity agonist binding sites: a light microscopic autoradiographic study. **Brain Res Bull**, v. 12, n. 3, p. 233-43, 1984.

WELLER, K.L. e SMITH, D.A. Afferent connections to the bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Res**, v.232, n.2, Jan 28, p.255-70. 1982.