UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências
FarmacêuticasCampus
de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

ESTUDO DA INIBIÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NO HIPOCAMPO VENTRAL SOBRE OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E CARDIOVASCULARES BASAIS INDUZIDOS PELO ESTRESSE CRÔNICO REPETIDO.

Bianca Meneghetti Scarambone

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Busnardo Santiago
Coorientador: Prof. Dr. Carlos César Crestani

Araraquara- SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências
FarmacêuticasCampus
de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

ESTUDO DA INIBIÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NO HIPOCAMPO VENTRAL SOBRE OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E CARDIOVASCULARES BASAIS INDUZIDOS PELO ESTRESSE CRÔNICO REPETIDO.

Bianca Meneghetti Scarambone

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, paraobtenção do título de Mestreem Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra.Cristiane Busnardo Santiago
Coorientador: Prof. Dr. Carlos César Crestani

Araraquara- SP

2023

Scarambone, Bianca Meneghetti.
S285e Estudo da inibição da neurotransmissão glutamatérgica no hipocampo ventral sobre os parâmetros comportamentais e cardiovasculares basais induzidos pelo estresse crônico repetido / Bianca Meneghetti Scarambone. – Araraquara: [S.n.], 2023.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa eDesenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Cristiane Busnardo Santiago.
Coorientador: Carlos César Crestani.

1. Estresse de restrição. 2. Hipocampo. 3. Glutamato. 4. DREADD. I. Santiago, Cristiane Busnardo, orient. II. Crestani, Carlos César, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo da inibição da neurotransmissão glutamatérgica no hipocampo ventral sobre os parâmetros comportamentais e cardiovasculares basais induzidos pelo estresse crônico repetido.

AUTORA: BIANCA MENEGHETTI SCARAMBONE
ORIENTADORA: CRISTIANE BUSNARDO SANTIAGO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Dra. CRISTIANE BUSNARDO SANTIAGO (Participaçao Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. FERNANDO HENRIQUE FERRARI ALVES (Participaçao Virtual)
Faculdade de Medicina / Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. MARCELO TADEU MARIN (Participaçao Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 29 de setembro de 2023

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara -
RODOVIA ARARAQUARA - JAÚ, Km 1, 14800903
http://www2.fcfar.unesp.br/#!/pos-graduacao/ciencias-farmaceuticas/CNPJ: 48.031.918/0025-00.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Fabiana, por sempre me dar amor e garantir minha educação; ao meu parceiro Gustavo pelo amor, paciência e incentivo em todos os momentos, e aos meus amigos presentes nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Quero primeiro agradecer a **Deus**, por ser meu guia, me proteger e me abençoar todos os dias da minha vida.

À **minha mãe Fabiana**, pelo amor, por sempre cuidar de mim com muita força e coragem. Obrigada por sempre acreditar em mim.

Ao meu namorado **Gustavo**, pelo amor, paciência, atenção e incentivo durante a realização desta pesquisa. Obrigada por dividir comigo todos os momentos felizes e difíceis também.

A minha orientadora **Cristiane Busnardo Santiago (Cris)**, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, e por contribuir grandemente com seus ensinamentos.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** (FCFar/UNESP) pelo espaço físico e equipamentos oferecidos para o desenvolvimento do projeto e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela a oportunidade.

Aos colegas de laboratório em especial: **Adrielly Santos, Lilian Liz, Lucas Barretto, Luana Giatti, Lucas Gomes** por toda ajuda durante os experimentos, análises e os conselhos que foram muito importantes na minha vida pessoal e profissional, e **Ligia Tavares, Gabriela Arruda, Vinicius Pelarin, Sara, Alex e Leandro** pela convivência, ajuda e momentos felizes.

A Faculdade de Medicina, em especial ao Laboratório do **Professor Morgan**, aos pesquisadores **Ivaldo de Jesus Almeida Belém Filho** e **Atlante Silva Mendes**, por toda ajuda para minha pesquisa e ajuda com o microscópio, além da recepção do Ivaldo em Ribeirão Preto, meu muito obrigada pelos ensinamentos.

Agradeço a secretária do departamento **Tirene Pavanelli**, e aos secretários do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas **Cláudia Molina, Victor Picchi Gandin, Denise Daré e Mariana Vicenzo** por todo profissionalismo e atenção.

Aos examinadores de qualificação e defesa, **Dra. Daniela Baptista de Souza, Prof. Dr**. **Marcelo Tadeu Marin** e **Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves** pelas pertinentes e futuras contribuições, e por terem aceitado fazer parte nesse momento muito importante.

A agência de fomento **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo suporte financeiro e pela concessão da Bolsa Concedida como Item Orçamentário em Auxílio / BCO - Mestrado - Fluxo Contínuo Processo # 2021/06709-8, processo vinculado ao Auxílio à Pesquisa Jovem Pesquisador FAPESP – Fluxo Contínuo Processo # 2018/04899-1.

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

RESUMO

A tecnologia quimiogenética de Receptores projetados ativados exclusivamente por medicamentos projetados (DREADD) foi utilizada para silenciamento neuronal induzido por Clozapina-N-Óxido (CNO). Foram utilizados DREADD+ que é DREADD hM4D Gi-acoplado, fundido com mCherry sob o controle do promotor CaMKIIa (neurônio glutamatérgico) e DREADD- que é a proteína verde fluorescente sob controle do promotor CaMKIIa. Os resultados demonstraram que os animais DREADD+ tratados com veículo e submetidos ao estresse crônico de restrição repetido (CRS) apresentaram um aumento na PAM basal sem alterações na FC basal quando comparados com os animais que não foram estressados (naive). Os animais DREADD+ tratados com veículo ou CNO e submetidos ao CRS não apresentaram alterações nas atividades simpática e parassimpática cardíacas, e na FC intrínseca quando comparados com os animais naive. Além disso, os animais DREADD- tratados com veículo ou CNO e submetidos ao estresse agudo de restrição (RS) não apresentaram alterações na PAM e FC basais, atividades simpática e parassimpática cardíacas, e na FC intrínseca quando comparados com os animais naive. Os resultados mostraram também que os o animais DREADD+ tratados com veículo e que foram submetidos ao CRS apresentaram um aumento do tempo de permanência no centro da arena no teste do campo aberto bem como um queda do tempo na periferia da arena, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico nos animais cronicamente estressados. O tratamento com CNO nos animais DREADD+ que foram submetidos ao CRS reverteu esse efeito no teste do campo aberto, sugerindo que a neurotransmissão glutamatérgica do hipocampo ventral (HV) medeia esse efeito do tipo ansiolítico nos animais cronicamente estressados. Os animais DREADD+ tratados com veículo ou CNO que foram submetidos ao CRS não apresentaram alterações no teste do labirinto em cruz elevado (LCE), no teste de esguicho de sacarose ou no teste do nado forçado (TNF) quando comparados com os animais naive. Os dados do presente estudo mostraram também que os animais DREADD- tratados com veículo e submetidos ao RS apresentaram uma redução no número de entradas nos braços abertos no teste do LCE quando comparados com os animais naive, sugerindo um efeito do tipo ansiogênico nos animais agudamente estressados.Os animais DREADD- tratados com veículo ou CNO submetidos ao RS não apresentaram alterações dos testes do campo aberto, do esguicho de sacarose e no TNF quando comparados com os animais naive. Diante dos presentes resultados, pode-se concluir que a neurotransmissão glutamatérgica do HV tem um papel facilitatório do efeito ansiolítico induzido pelo CRS. Além disso, também pode-se concluir que o estresse crônico causa um aumento da PAM basal e o estresse agudo causa um efeito do tipo ansiogênico.

Palavras-chave : estresse de restrição; hipocampo; glutamato; DREADD.

ABSTRACT

Designed Receptors Exclusively Activated by Designed Drugs – DREADD's chemogenetic technology was used for neuronal silencing induced by Clozapine-N-Oxide (CNO). DREADD+ which is Gi-coupled DREADD hM4D fused with mCherry under the control of the CaMKIIa promoter (glutamatergic neuron) and DREADD- which is the green fluorescent protein under control of the CaMKIIa promoter. The results showed that vehicle-treated DREADD+ animals that were submitted to repeated chronic restraint stress (CRS) showed an increase baseline MAP without changes in baseline HR when compared to animals that were not stressed (naive). Vehicle or CNO-treated DREADD+ animals that were submitted to CRS showed no changes in cardiac sympathetic and parasympathetic activities, and intrinsic HR when compared to naive animals. Besides, Vehicle or CNO-treated DREADD- animals that were submitted to acute restraint stress (RS) showed no changes in baseline MAP and HR, cardiac sympathetic and parasympathetic activities, and intrinsic HR when compared to naive animals. Vehicle-treated DREADD+ animals that were submitted to CRS showed an increase the time spent in the center of the arena as well as a drop in the time spent in the periphery of the arena, both observed in the open field test (OFT), suggesting an anxiolytic-like effect in chronically stressed animals. CNO treatment in DREADD + animals that underwent CRS reversed that effect, suggesting that ventral hippocampus (HV) glutamate neurotransmission mediates that anxiolytic-like effect in chronically stressed animals. Vehicle or CNO-treated DREADD+ animals that were submitted to CRS showed no changes in the elevated plus maze test (EPM) in the Splash test or Forced Swimming test (FST) when compared to naive animals. Data from the present study also showed that Vehicle-treated DREADD- animals submitted to RS showed a decrease in the number of open arm entries in the EPM test when compared to naive animals, suggesting an anxiogenic-like effect in acutely stressed animals. Vehicle-treated DREADD- animals submitted to RS showed no changes in OFT, Splash test and FST when compared to naïve animals. Given the present results, it can be concluded that the HV glutamate neurotransmission plays a facilitatory role in the anxiolytic-like effect induced by CRS. Furthermore, it can also be concluded that chronic stress causes an increase in baseline MAP and acute stress causes an anxiogenic-like effect.

Keywords: restraint stress; glutamatergic neuron, hippocampus, DREADD.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE ABREVIATURAS 11
1. INTRODUÇÃO 12
2. REVISAO DA LITERATURA 16
2.1 Estresse 16
2.2. Estresse, Hipocampo e Glutamato 18
2.3. Modelos Animais 22
2.4. Designed Receptors Exclusively Activated by Designed Drugs (DREADDS) 24
3. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO 27
4. MATERIAIS E MÉTODOS 27
4.1. Animais 27
4.2. Cirurgia Estereotáxica e injeção intrahipocampal 27
4.3. Drogas e soluções utilizadas 29
4.4. Protocolos de estresse 29
4.5 Labirinto em cruz elevado (LCE) 30
4.6 Teste do Campo Aberto (do inglês, open field test - OFT) 30
4.7 Teste do nado forçado (TNF) 31
4.8 Teste Esguicho de Sacarose 31
4.9 Canulação da Arteria Femoral 32
5. Registro da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca 35
5.1 Avaliação da Atividade Autonômica Cardíaca e Frequência Cardíaca Intrínseca (FCi). 37
5.2 Perfusão dos animais. 37
5.3 Análise Estatística 38
5.4 Imunofluorescência. 39
6. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS 34
6.1 Efeito da Inativação de neurônios glutamatérgicos do HV por meio da técnica de DREADD durante um protocolo de estresse crônico repetido sobre os parâmetros cardiovasculares basais e atividade autonômica cardíaca 40
6.2 Efeito da Inativação de neurônios glutamatérgicos do HV por meio da técnica de DREADD durante um protocolo de estresse crônico repetido sobre as respostas comportamentais 41
6.3 Efeito inespecífico do CNO nos animais DREADD- durante um protocolo de estresse

agudo sobre os parâmetros cardiovasculares basais e a atividade autonômica cardíaca 43
6.4 Efeito inespecífico do CNO nos animais DREADD- durante um protocolo se estresse agudo sobre as respostas comportamentais 44
7. Resultados 47
7.1 Expressão do DREADD hM4Di mCherry no hipocampo ventral (HV) 47
7.2 Efeito da Inativação de Neurônios glutamatérgicos do HV por meio da técnica de DREADD durante um protocolo de estresse de restrição crônico sobre os parâmetros cardiovasculares basais e atividade autonômica cardíaca 48
7.3 Efeito da Inativação de Neurônios glutamatérgicos do HV por meio da técnica de DREADD durante um protocolo de estresse de restrição crônico sobre as respostas comportamentais. 50
7.4 Expressão de DREADD(-) no Hipocampo Ventral (HV) 54
7.5 Efeito inespecífico do CNO nos animais DREADD- durante um protocolo de estresse de restrição agudo sobre os parâmetros cardiovasculares basais e a atividade autonômica cardíaca 55
7.6 Efeito inespecífico do CNO nos animais DREADD- durante um protocolo de estresse de restrição agudo sobre as respostas comportamentais. 58

8. DISCUSSÃO 61
8.1 Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica no HV nas respostas cardiovasculares basais, atividade autonômica cardíaca e FCi ao estresse crônico de restrição. 62
8.2 Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica no HV nas respostas comportamentais ao estresse crônico de restrição. 64
8.3 Efeito inespecífico do CNO nas respostas cardiovasculares basais, atividade autonômica cardíaca e FCi bem como nas respostas comportamentais ao estresse agudo de
restrição 68

9. RESULTADOS 71
10. REFERÊNCIAS 72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hipótese do projeto: A neurotransmissão glutamatérgica do hipocampo ventral (HV) participa da modulação das respostas autonômicasbasais e comportamentais induzidas pelo estresse crônico de restrição (CRS). Imagem criada pelo BioRender. 17

Figura 2 - Representação esquemática do hipocampo em humanos e roedores 21

Figura 3 - Representação dos DREADDs disponíveis com sua nomenclatura de acordo com a literatura, e seus potenciais efeitos neuronaismediante a ativação..... 25

Figura 4 – Diagrama esquemático da construção de DREADDs. Criado pelo BioRender..... 39

Figura 5 - Desenho experimental representado pelo protocolo utilizado em animais DREADDs (+).....42

Figura 6 - Desenho experimental representado pelo protocolo utilizado em animais DREADDs (+) 45

Figura 7 - . Imagens indicando os locais de injeção de DREDD hM4Di mCherry no Hipocampo Ventral (HV)..... 47

Figura 8 – Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM) e frequência Cardíaca (FC) de animais DREADD+ 48

Figura 9 -Atividade autonômica cardíaca e FC intrínseca de animais DREADD+ **.....**..49

Figura 10 – Parâmetros comportamentais avaliados durante a exploração do labirinto em cruz elevado (LCE) de animais DREADD+ 50

Figura 11 - Parâmetros comportamentais avaliados durante a exploração do Campo Aberto realizado em animais DREADD (+)..... 51

Figura 12 - Parâmetros comportamentais avaliados durante o teste de esguicho

de sacarose em animais DREADD (+).....
.....52
Figura 13 - Parâmetros comportamentais avaliados durante o teste de nado forçado em animais DREADD (+)
..... 53
Figura 14 - Imagens indicando os locais de injeção de DREDD (-) no Hipocampo Ventral
(HV) 54
Figura 15 - Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM) e frequência Cardíaca (FC) de animais DREADD (-
).....55
Figura 16 - Atividade autonômica cardíaca e FC intrínseca de animais DREADD 56
Figura 17 - Parâmetros comportamentais avaliados durante a exploração do labirinto em cruz elevado (LCE) de animais DREADD (-)
.....57
Figura 18 - Parâmetros comportamentais avaliados durante a exploração do Campo Aberto realizado em animais DREADD (-). 58
Figura 19 - Parâmetros comportamentais avaliados durante o teste de esguicho de sacarose em animais DREADD (-). 59
Figura 20 - Parâmetros comportamentais avaliados durante o teste de nado forçado em animais DREADD (-
).....60

LISTA DE ABREVIATURAS

AAV – Vetor adenoviral Associado

ACHT – Hormônio adrenocorticotrófico

CNO – Clozapina N óxido

CRS – Estresse crônico de restrição

DG – Giro Denteado

DREADDS – Desing receptor exclusively activated

by designer drugs

EGFP – Expressão de proteína fluorescente verde aumentada

FC – Frequência Cardíaca

TNF – Teste do Nado Forçado

GCs – Glicocorticóides

Gi – Isoforma inibitória de proteína G

GPCRs – Receptor de membrada

acoplado a proteína G

HPA – Hipotálamo-hipófise-adrenocortical

LCE – Teste do

Labirinto em Cruz

Elevado LS – Septo

Lateral

NAc – Núcleo Accumbens

OFT – Teste do Campo Aberto

PAM – Pressão Arterial Média

SNC – Sistema Nervoso Central

1. INTRODUÇÃO

O estresse emocional é uma condição inevitável que causa desequilíbrio fisiológico e psicológico no corpo (AMIN *et al*., 2015). As informações relacionadas ao estresse de todos os principais sistemas sensoriais são transportadas para o sistema nervoso central (SNC), que recruta sistemas neurais e neuroendócrinos para gerar uma resposta. Esta resposta fisiológica ao estresse envolve um conjunto eficiente de sistemas (ULRICH; HERMAN, 2009) que promovem ajustes fisiológicos, incluindo alterações neuroendócrinas (por exemplo, ativação do eixo hipotálamo- hipófise-adrenal - HPA) e cardiovasculares (por exemplo, aumento da pressão arterial- PA e frequência cardíaca-FC) desencadeados durante situações aversivas. (CRESTANI, 2016; DAMPNEY, 2015; ULRICH; HERMAN, 2009)

A exposição repetida a estímulos estressantes desencadeia uma série de adaptações fisiológicas (HERMAN, 2013) (por exemplo reduções das respostas cardiovasculares e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal - HPA) que atuam de forma conjunta para limitar os impactos negativos da resposta ao estresse (GIROTTI *et al*., 2006; HERMAN, 2013), reduzindo o risco cardiovascular e o desenvolvimento de processos inflamatórios. Além disso, a elevada sinalização do feedback negativo exercido pelos glicocorticóides em estruturas límbicas como hipocampo (HERMAN, 2013) atuam no intuito de conter a ativação do eixo HPA. É também possível que a habituação do estresse seja mediada por alterações funcionais e estruturais em regiões envolvidas com a resposta ao estresse, uma vez que, por exemplo, a exposição a estressores induz remodelamento dendrítico em células piramidais hipocampais e diminuição da neurogênese no giro denteado do hipocampo de animais experimentais (MAGARIÑOS *et al*., 1997; GOULD, 1999), podendo impactar a regulação das respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse.

O estresse agudo por restrição é um modelo de estresse não-condicionado e inescapável que causa respostas neuroendócrinas e autônomas caracterizadas por elevação nos níveis

plasmáticos de glicocorticoides, aumento 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; VAN LOON, 1989; CRESTANI *et al*., 2010). Adicionalmente, o estresse por restrição desencadeia consequências emocionais retardadas caracterizadas por efeito do tipo ansiogênico (HARTMANN *et al*., 2019; BUSNARDO *et al*., 2019). Estudos prévios têm demonstrado a participação do hipocampo na modulação de respostas fisiológicas e comportamentais induzidas por estresse agudo de restrição (HARTMANN *et al*., 2019; MORAES *et al*., 2014; SCOPINHO *et al*., 2013) . No entanto, pouco se sabe sobre a participação dessa estrutura na modulação das repostas ao estresse crônico repetido, em especial sobre as consequências relacionadas as respostas autonômicas.

Diante das evidências acima, o presente projeto tem por hipótese que a neurotransmissão glutamatérgica do hipocampo ventral (HV) participa das respostas comportamentais relacionadas ao estresse crônico repetido (Figura 1).

Para isso, utilizamos a tecnologia quimiogenética com a aplicação de receptores projetados ativados exclusivamente por drogas projetadas (DREADDs), que permitiu a inativação de tipos específicos de neurônios, no caso, neurônios glutamatérgicos.

A tecnologia DREADD representa uma nova ferramenta capaz de modular in vivo a sinalização da maior classe de receptores, os receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (CURADO, 2017). Os DREADDs são receptores muscarínicos mutados que perderam a sua capacidade de resposta a seus ligantes endógenos ou sintéticos, e que podem ser ativados com alta potência e eficácia por um ligante farmacologicamente inerte, a Clozapina N-Óxido (CNO) (WESS *et al*., 2013).

O DREADD hM4Di viralmente traduzido é um receptor mutado a partir do receptor muscarínico do tipo M4 que está acoplado a uma proteína G inibitória (Gi) (WESS *et al*., 2013).O silenciamento neuronal mediado pelo hM4Di envolve a ativação mediada pela Gβγ dos

canais de potássio (K +) retificadores de influxo sensíveis a proteína G (GIRK), levando a hiperpolarização (WESS *et al*., 2013).

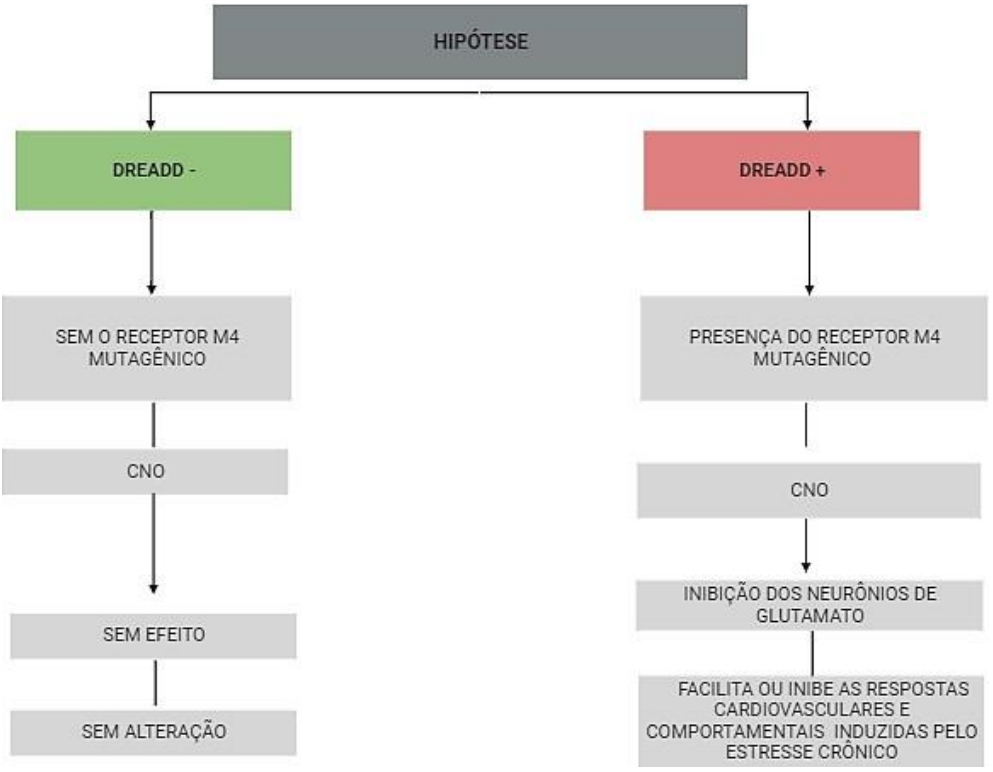


Figura 1. Hipótese do projeto: A neurotransmissão glutamatérgica do hipocampo ventral (HV) participa da modulação das respostas autonômicas basais e comportamentais induzidas pelo estresse crônico de restrição (CRS). Imagem criada pelo BioRender.

2. REVISAO DA LITERATURA

2.1 Estresse

O estresse é fundamental para sobrevivência do indivíduo, e os sistemas biológicos sofisticados sofreram evolução com o intuito de se ajustar e lidar eficientemente com ele. (MOBERG, 1985). Portanto, o estresse construtivo também chamado de *"eustress"* atua de maneira positiva, em que o indivíduo está em equilíbrio ou dentro de limites toleráveis (VENKATESH, 2015) . No entanto, quando está fora dos limites toleráveis, o estresse excessivo pode levar a sobrecarga mental e física do indivíduo, tornando-se um estresse negativo também denominado de *"distress"*(VENKATESH, 2015).

O estresse emocional é uma condição inevitável que causa desequilíbrio fisiológico e psicológico no corpo (AMIN *et al*., 2015). Hans Hugo Bruno Seyle definiu o estresse biológico como "a resposta neuroendócrina não específica do corpo" - nomeado inicialmente como Síndrome Geral de Adaptação - que envolve três estágios progressivos: 1. Reação de Alarme na qual o organismo reage produzindo e liberando adrenalina, noradrenalina e glicocorticóides; 2. Resistência, caracterizada pela adaptação, o corpo aprende a lidar eficientemente com o agente estressor e 3. Exaustão caracterizado por um esgotamento das reservas de energia e a perda da capacidade adaptativa, levando a fadiga ou doenças relacionadas ao estresse. (SELYE, 1946).

A sobrevivência e a adaptação de todas as espécies às situações de estresse requerem um adequado e coordenado conjunto de respostas fisiológicas (CRESTANI, 2016; STERLING, 2012; ULRICH; HERMAN, 2009).

As informações relacionadas ao estresse de todos os principais sistemas sensoriais são transportadas para o sistema nervoso central (SNC), que recruta sistemas neurais e neuroendócrinos para gerar uma resposta e essas respostas fisiológicas ao estresse são geradasa partir de alterações na atividade autônoma, neuroendócrina e imunológica (CRESTANI, 2016; MCEWEN, 2017; ULRICH; HERMAN, 2009).

O estresse pode ser dividido de forma duração-dependente em agudo (curto prazo) e

crônico (longo prazo), em que no estresse agudo, há uma ativação sem precedente à um estímulo aversivo e os conflitos são curtos e de intensidade exacerbada (RIVERA, 2002) . No estresse crônico, uma ativação frequente e/ou prolongada ocorre durante a exposição repetida auma mesma (estresse homotípico) ou distintas (estresse heterotípico) situações aversivas, ou seja, em longo prazo a exposição repetida a agentes estressores pode levar a danos teciduais e desenvolvimento ou agravamento de doenças ou ainda levar à uma adaptação do organismo frente ao estresse (DANESE; MCEWEN, 2012; HERMAN, 2013) que vão depender da cronicidade, severidade, controlabilidade e previsibilidade do estresse (HERMAN, 2013).

O estresse por restrição é um modelo de estresse não-condicionado e inescapável bem aceito na literatura no qual consiste em colocar o animal em um tubo cilíndrico de contenção (BARRON; VAN LOON, 1989). Este modelo causa respostas neuroendócrinas e autônomas caracterizadas por elevação nos níveis plasmáticos de glicocorticoides, aumento da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), modulação da atividade do barorreflexo e redução da temperatura cutânea, nas quais são mantidas durante todo o período de estresse (BARRON; VAN LOON, 1989; CRESTANI *et al*., 2010). Adicionalmente, o estresse por restrição desencadeia consequências emocionais retardadas caracterizadas por efeito do tipo ansiogênico (BUSNARDO *et al*., 2019; HARTMANN *et al*., 2019).

O estresse crônico de restrição induz também comportamento do tipo depressivo e redução nos níveis plasmáticos de corticosterona e hormônio adrenocorticotroina (ACTH), déficits de aprendizado e memória e danos neuronais em estruturas cerebrais como hipocampo (CHIBA *et al*., 2012; HUANG *et al*., 2015; MOGRABI *et al*., 2020; NEWSON *et al*., 2013) .

2.2. Estresse, Hipocampo e Glutamato

O hipocampo está localizado na base do lobo temporal medial e estende-se ao longo de um eixo dorsoventral em roedores, correspondendo a um eixo posterior-anterior em humanos (STRANGE *et al*., 2014) . O hipocampo, propriamente dito, é caracterizado por várias regiões

distintas em mamíferos, incluindo áreas chamadas de Campos do Corno de Ammon (CA1, CA2, CA3 E CA4). O hipocampo, o Giro Denteado (DG), os Córtex Entorrinal e Subcular constituem a formação hipocampal. O hipocampo apresenta conectividade com múltiplas estruturas subcorticais como o Septo Lateral (LS), o Núcleo Accumbens (NAc), a amigdala e hipotálamo, que estão envolvidos em respostas comportamentais, endócrinas e autonômicas. (FARES *et al*., 2019; GIAP *et al*., 2000).

O hipocampo, quando visto em cortes sagitais, assume a forma de um "C" invertido em roedores e pode ser funcionalmente dividido em hipocampo dorsal (HD) e ventral (HV). (Figura 2) (PENTKOWSKI *et al*., 2006), na qual na qual o HV está predominantemente associado ao estresse, emoções e afeto e o HD desempenha principalmente funções cognitivas como aprendizado espacial e memória contextual (FANSELOW; DONG, 2010).

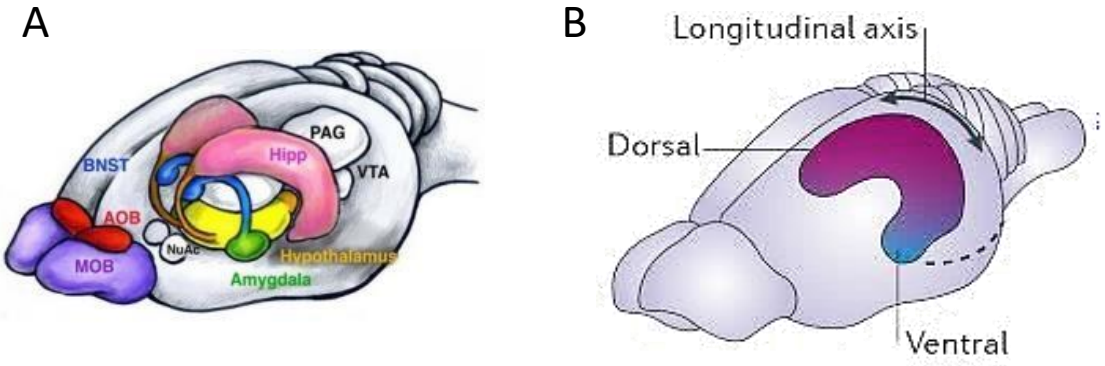


Figura 2: A. Representação esquemática comparando as principais estruturas do sistema límbico de roedores, destacado em rosa a localização do hipocampo (hipp). Fonte: adaptada (SOKOLOWSKI; CORBIN, 2012).
B. Representação esquemática das sub-regiões hipocampo dorsal (acima) e hipocampo ventral (abaixo), em roedores. Fonte: adaptada (KISHI, 2006; STRANGE, 2014).

O hipocampo possui grande densidade de receptores para glicorticóides (GCs) que, quando ativados desempenham um papel importante na resposta ao estresse, regulando a atividade do eixo HPA (HERMAN, 2013) . Tem sido demonstrado que estruturas límbicas como o hipocampo estão implicadas em conter a ativação do eixo HPA através de um

mecanismo de feedback negativo onde os glicocorticóides liberados na circulação por situações estressantes vão ativar receptores de glicocorticóides e mineralocorticóides nas estruturas límbicas promovendo inibição do eixo HPA (HERMAN, 2013).

O eixo HPA constitui um dos principais sistemas endócrinos que mantem a homeostase do organismo em situações de desafio ou estresse. O principal hormônio que atua na resposta do estresse é o cortisol (em humanos), e corticosterona (em roedores) que é liberado na corrente sanguínea e vai agir sobre diversos órgãos e tecido (VON WERNE *et al*., 2012).

Quando o organismo sofre um estímulo estressante, o eixo HPA é ativado, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) secreta o fator liberador de corticotrofina (CRH) que estimula a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior que estimula a síntese de glicocorticoides (GCs) pelo córtex da glândula adrenal na circulação sanguínea. (LÓPEZ *et al*., 1999). Como mencionado anteriormente, para que os níveis de GCs sejam regulados, existe um controle de feedback negativo, fundamental para o estabelecimento de concentrações basais dos hormônios quando o eixo é ativado intensamente durante uma situação estressante restabelecendo a homeostase (HERMAN; CULLINAN, 1997).

Por outro lado, a exposição a estressores pode induzir alterações morfológicas como remodelamento dendrítico das células piramidais hipocampais e diminuição da neurogênese no Giro Denteado do hipocampo que podem ser mediadas por aumento de GCs que teria um efeito neurotóxico no hipocampo, predispondo ao desenvolvendo de transtornos psicológicos como depressão (BAIN *et al*., 2004; JOCA *et al*., 2007). Portanto, tem sido sugerido que os glicocorticóides estão envolvidos na supressão da neurogênese, levando ao encolhimento do GD (CAMERON; GOULD, 1994). No entanto, o papel exato dos glicocorticóides na neurogênese do hipocampo ainda é controverso, pois durante a experiência sexual, o alto nível de glicocorticóides mostrou aumentar a neurogênese (LEUNER *et al*., 2010).

Estudos neuroquímicos e eletrofisiológicos mostram que o processo de neurogênese no hipocampo gera uma série de neurônios funcionais e integrados aos circuitos hipocampais e que esses neurônios poderiam repor a perda de outros neurônios, conferindo maior plasticidade ao

hipocampo (JOCA *et al*., 2003). Os novos neurônios são mais susceptíveis a sofrerem potencialização de longa duração no hipocampo (LTP -Long-Term Potentiation), um fenômeno relacionado ao aprendizado e à memória.

O aprendizado de novas tarefas facilita a neurogênese, enquanto seu bloqueio prejudica o aprendizado em tarefas que dependem do hipocampo. Situações de estressepoderiam, por inibir a neurogênese (JOCA *et al*., 2003; SIQUEIRA-BATISTA; ANTONIO, 2008).

O sistema glutamatérgico hipocampal tem papel fundamental nos processos envolvendo plasticidade neuronial (neurogênese, remodelação dendrítica e potencialização de longa duração), possivelmente atuando de forma sinérgica com os glicocorticóides (JOCA *et al*., 2003; MCEWEN., 2000). O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante do SNC, e participa de múltiplas vias de controle das funções cardiovasculares, neuroendócrinas, metabólicas e comportamentais (ZHOU; DANBOLT., PADOVAN *et al*., 2000; BUSNARDO *et al*., 2013, CAMPOS; RITTER, 2015).

O glutamato é liberado pelos neurônios do hipocampo e se liga a receptores de glutamato presentes em neurônios pós-sinápticos, desencadeando um influxo de íons que pode levar à despolarização e à ativação desses neurônios. Existem vários tipos de receptores de glutamato no hipocampo, incluindo receptores ionotrópicos ionotrópicos N- metil-D-aspartato (NMDA), Amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolproprionato (AMPA) e kainato e receptores metabotrópicos (ligados a proteína G). Os receptores NMDA são particularmente importantes para a plasticidade sináptica de longa duração, que é considerada a base neural da aprendizagem e da memória (LIU *et al*., 2022).

De acordo com Hagena e colaboradores, a relação entre os receptores de glutamato e a plasticidade sináptica no hipocampo em ratos sugere que a plasticidade sináptica depende de NMDA e é essencial para a formação de memória e aprendizagem, em resumo, o glutamato desempenharia um papel fundamental na formação do hipocampo (HAGENA *et al*., 2016).

Adicionalmente, estudos pré-clínicos indicaram que o tratamento repetido com antagonistas dos receptores glutamatérgicos NMDA possui propriedades antidepressivas

em diferentes modelos animais (BERMAN *et al*., 2000; PETRIE *et al*., 2000; SOFIA; HARAKAL., 1975; TRULLAS; SKOLNICK., 1990) e evidências apontam o hipocampo como um alvo importante para ação desses fármacos (JOCA *et al*., 2007). Corroborando com esses dados, estudos comportamentais mostram que o tratamento crônico com antidepressivos reduz a liberação de glutamato nos sinaptossomas do hipocampo, desregula os receptores NMDA e diminui a responsividade ao glutamato, sugerindo o envolvimento do sistema glutamatérgico do hipocampo na neurobiologia dos distúrbios relacionados ao estresse (BONANNO *et al*., 2005; BOYER *et al*., 1998; ZAHORODNA; BIJAK., 1999).

2.3. Modelos Animais

A utilização de modelos animais na pesquisa básica para investigar os aspectos fisiológicos e comportamentais dos transtornos mentais representa uma ferramenta fundamental para o entendimento de mecanismos subjacentes às alterações clínicas observadas, auxilia na elaboração de possíveis alvos terapêuticos, além de representar uma importante base para a identificação de fatores que contribuem para a vulnerabilidade ou resiliência individual (GIRARDI, 2013).

Em modelos animais, diversos protocolos tem sido utilizados onde testes comportamentais são amplamente utilizados na investigação de doenças mentais, , por exemplo Teste do Campo Aberto e o Teste de Labirinto em Cruz Elevado para estudo de comportamentos relacionados à ansiedade, e o Esguicho de Sacarose e o Teste do Nado forçado para estudo de comportamentos relacionados à depressão.

No Campo Aberto, geralmente avalia-se o comportamento exploratório em um ambiente desconhecido. Além de medir a ambulação geral, pode-se também comparar a exploração em diferentes regiões da arena. Os roedores tendem a permanecer na zona periférica, que é uma zona protegida pelas paredes. Drogas ansiolíticas tendem a aumentar a exploração da região

central. As manipulações que diminuem a ambulação total, ou aumentam a permanência na periferia em relação a animais controle são consideradas ansiogênicas (CRAWLEY; GOODWIN., 1980).

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um teste que permite avaliar o comportamento tipo ansiogênico em roedores. O labirinto consiste em uma plataforma em formato de cruz, elevada do solo a geralmente 50 cm, com dois braços protegidos por paredes altas e dois braços abertos. O animal é colocado no centro do labirinto e deixado para exploração livre por, geralmente, 5 minutos. Os roedores expressam uma preferência pelos compartimentos protegidos, porém, também exploram os braços abertos, considerados mais aversivos, com uma menor frequência. Consideram-se ansiolíticas as manipulações (comportamentais ou farmacológicas) que provocam aumento na exploração (número de entradas e/ou tempo de permanência) dos braços abertos e ansiogênicas as manipulações que provocam diminuição na exploração dos braços abertos, em relação a indivíduos controle (PELLOW *et al*., 1985).

O Teste do Nado Forçado (TNF) baseado no modelo ou paradigma de "desemparo comportamental" (PORSOLT *et al*., 1977), o teste de nado forçado é um teste comportamental empregado na avaliação de fármacos com potencial atividade antidepressiva (BORSINI *et al*., 1989; DAL-ZOTTO *et al*., 2000; DETKE *et al*., 1997; PORSOLT *et al*., 1977; KITAMURA *et al*., 2004). Neste teste, roedores são expostos a uma situação supostamente aversiva: nadar em um tanque cilíndrico com uma quantidade de água que impeça o apoio das patas no fundo do cilindro e que impeça a fuga pela borda superior.

No início do teste os animais nadam e fazem movimentos de "escalar" as paredes internas do cilindro e com o passar do tempo adotam uma postura de imobilidade. Uma possível explicação deste padrão comportamental é que após o período inicial de "luta", conhecido pelo termo "desemparo comportamental" utilizado por Porsolt e colaboradores em 1977, e depois os animais "percebem" que não tem rota de fuga do cilindro e "desistem" de tentar escapar,

adotando uma postura de imobilidade (PORSOLT *et al*., 1977).

O Esguicho de Sacarose tem por objetivo analisar o autocuidado e as dificuldades emocionais. A atividade de autolimpeza (“gromming”) em reposta a uma solução doce (solução de sacarose a 10%) é considerada como uma medida indireta da ingestão de solução palatável. O grooming é um comportamento inato e instintivo observado em roedores, no qual eles dedicam tempo para a higienização de suas pelagens (SMOLINSKY *et al*., 2009). Esse comportamento pode ser empregado como um indicador na avaliação de níveis de estresse e anedonia (SMOLINSKY *et al*., 2009). O comportamento de higiene reduzido é considerado como um comportamento do tipo depressivo em ratos (BOUGUIYOUD, 2022). A solução é jorrada no revestimento dorsal do animal, com eles permanecendo em caixas individuais e filmados por um período de 5 minutos para registro. (AMINI- KHOEI *et al*., 2017).

2.4. Designed Receptors Exclusively Activated by Designed Drugs (DREADDS)

Os DREADDS são amplamente utilizados em estudos de neurociência para investigar a função de circuitos neurais em animais e representam uma nova ferramenta capaz de modular in vivo a sinalização da maior classe de receptores, os receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (CURADO, 2017), que com mais de 800 membros, os GPCRs são considerados a maior classe de receptores de sinalização transmembrana sendo responsáveis pela modulação de uma ampla gama de respostas fisiológicas (ELLISDON; HALLS., 2016).

Os DREADDs são receptores muscarínicos mutados de modo que perderam a capacidade de resposta a seus ligantes naturais (ARMBRUSTER *et al*., 2007). Em vez disso, eles incorporam receptores sintéticos que podem ser ativados somente por um metabólito farmacologicamente inerte da droga antipsicótica atípica clozapina (clozapina-Nóxido - CNO). (ALEXANDER *et al*., 2009; FERGUSON *et al*., 2011). Estruturalmente o CNO difere da Clozapina somente pela presença do grupo N-óxido (WESS, 2013; SMITH; KYLE *et al*.,

2016). Os níveis plasmáticos de CNO atingem seu pico em 15 minutos e declinam significativamente após 2 horas, com a administração intraperitoneal (ip) de 1mgkg de CNO em camundongos (WESS, 2013). Apesar da curta meia-vida plasmática do CNO, os efeitos biológicos observados após o tratamento agudo em animais experimentais que expressam DREADD geralmente apresentam uma duração muito mais prolongada (6-10 horas) (WESS, 2013).

Vários promotores são inseridos nos DREADDS para selecionar quais células-alvo serão infectadas (ROTH, 2016), incluindo específicos de neurônios (por exemplo, sinapsina; hSyn) ou preferencias a tipos específicos de neurônios (por exemplo, dinorfina ou encefalina; CaMKII, que são preferenciais para células glutamatérgicas corticais (SMITH, .2016).

Embora o promotor CaMKIIα seja preferencial para neurônios glutamatérgicos corticais, pode atingir também neurônios GABAérgicos (VERES, 2023). Trabalhos prévios daliteratura também utilizaram o promotor CaMKIIα para expressão de DREADD, visando especificamente neurônios hipocampais excitatórios como as células granulares no giro denteado (DG) e as células piramidais nas regiões CA do hipocampo (GOOSEENS, 2021; STHITAPRANJYA, 2019). Outra isoforma da CaMKII, γCaMKII, parece ser expressa especificamente em neurônios inibitórios no hipocampo (HE, 2021).

Os receptores hM1Dq, hM3Dq e hM5Dq foram os primeiros DREADDs sintetizados, todos são derivados do receptor muscarínico humano que está acoplado a uma proteína Gq (ligada a uma fosfolipase C) e podem ser usados como DREADDs excitatórios (ALEXANDER *et al.*, 2009; FERGUSON *et al*., 2011; ROTH, 2016). O DREADD hM4Di viralmente traduzido é um receptor mutado a partir do receptor muscarínico do tipo M4 que está acoplado a uma proteína G inibitória (Gi) (WESS *et al.*, 2013). Até o momento, existem três Gi- DREADDs: hM2Di, hM4Di e KORD. Destes, hM2Di e hM4Di podem ser ativados por CNO, Composto 21 e Perlapina (ARMBRUSTER *et al*., 2007). DREADD inibitório hM4Di é o mais usado de

acordo com a literatura pois relatam um silenciamento neuronal bem sucedido (BOURANE *et al*., 2015; URBAN; ROTH, 2015). O DREADD acoplado a Gs (estimulatória) foi desenvolvido trocando as regiões intracelulares do receptor β adrenérgico de eritrócitos de peru por regiões equivalentes de um M3 DREADD de rato para criar um Gs-DREADD de rato que atua aumentando as concentrações intracelulares de adenosina monofostado cíclica (cAMP) (GUETTIER *et al*., 2009; ROTH, 2016). Finalmente, um DREADD que aparentemente sinaliza exclusivamente via β-arrestina foi desenvolvido, o (Rq(R165L) (NAKAJIMA; WESS., 2012). Observa-se na figura 3 os DREADDs atualmente disponíveis.

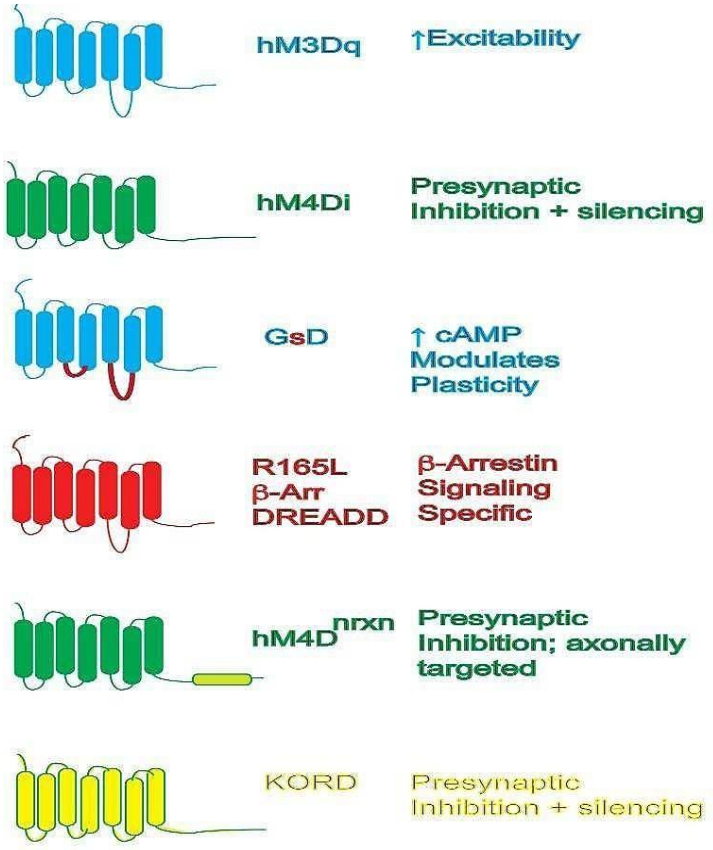


Figura 3: DREADDs atualemnte disponíveis, com sua nomenclatura de acordo com a literatura, e seus potenciais efeitos neuronais mediante a ativação. Fonte Adaptada: DREADDs for Neuroscientists (ROTH, 2016).

De acordo com o estudo de Gomez e colaboradores, foi utilizada a tecnologia DREADD para ativar seletivamente os neurônios do hipocampo em camundongos, e essa ativação

aumentou a liberação de glutamato nessa região cerebral. Essa ativação dos neurônios do hipocampo por meio dos DREADDS aumentou a plasticidade sináptica no hipocampo, o que sugere que a ativação seletiva de neurônios do hipocampo por meio dos DREADDs pode ser uma ferramenta útil para o estudo da plasticidade sináptica e função neural (GOMEZ *et al.*, 2017).

De acordo com a literatura o efeito da modulação DREADD na potencialização de longo prazo (LTP), uma forma de plasticidade sináptica, é limitada, especialmente no hipocampo (LÓPEZ *et al.*, 2016). Portanto, é fundamental ter uma compreensão mais clara de como os DREADDs induzem alterações na função sináptica no hipocampo, uma vez que, essas modificações podem alterar o aprendizado, o desempenho da memória e, muito provavelmente, as respostas ao estresse.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o efeito da inativação de neurônios glutamatérgicos do HV por meio da técnica de DREADD durante um protocolo de estresse crônico repetido sobre as respostas cardiovasculares basais bem como sobre as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade e a à depressão. Para tanto, os objetivos específicos foram:

1) Avaliar o efeito da inativação da neurotransmissão glutamatérgica do HV pela técnica de DREADD+ sobre as alterações induzidas pela exposição a um protocolo de 21 dias de estresse crônico de restrição (CRS) nos parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e no balanço autonômico cardíaco (atividade simpática e parassimpática cardíacas; e frequência cardíaca intrínseca);
2) Avaliar o efeito da inativação da neurotransmissão glutamatérgica do HV pela técnica de

DREADD+ sobre as alterações induzidas pela exposição a um protocolo de 21 dias de estresse crônico de restrição (CRS) nas respostas comportamentais do tipo ansiogênicas observadas nos teste do labirinto em cruz elevado e campo aberto e do tipo depressivas observadas no teste de esguicho de sacarose e no teste do nado forçado;

3) Avaliar o efeito inespecífico da Clozapina-N-Óxido (CNO) sobre as alterações induzidas pela exposição a um protocolo de estressde agudo de restrição (RS, 2h) nos parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e no balanço autonômico cardíaco (atividade simpática e parassimpática cardíacas; e frequência cardíaca intrínseca);
4) Avaliar o efeito inespecífico da Clozapina-N-Óxido (CNO) sobre as alterações induzidas pela exposição a um protocolo de estressde agudo de restrição (RS, 2h) nas respostas comportamentais do tipo ansiogênicas observadas nos teste do labirinto em cruz elevado e campo aberto e do tipo depressivas observadas no teste de esguicho de sacarose e no teste do nado forçado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar com peso corporal variando entre 250-270g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP). Os animais foram transferidos para o Biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAr/UNESP) no mínimo sete dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (23±2°C) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 7h), com acesso livre a alimento (ração) e água. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAr/UNESP com o número 02/2021.

4.2. Cirurgia Estereotáxica e injeção intrahipocampal de DREADD.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (87mg/kg) e xilazina (13mg/kg), injetada por via intraperitonial (0,1 ml para cada 100 g de peso do animal). Após a tricotomia, a cabeça do rato foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, EUA), e foi realizada assepsia do campo cirúrgico com iodo. Para redução do sangramento durante a cirurgia, foram injetados 0,3 ml de solução de lidocaína com vasoconstritor. A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada a 10% (BUSNARDO *et al*., 2013). Todas as coordenadas tiveram como referência parâmetros obtidos do Atlas de Paxinos & Watson (1997), e foram como segue:

Hipocampo Ventral (HV):

Ântero-posterior: -5,0 mm em relação à a linha do bregma; Lateral: +5,2 mm a partir da linha média;

Vertical: -5,0 mm em relação ao osso; Abaixamento da barra do incisivo = 3,2 mm

Após realizada a incisão na pele, foram feitos orifícios no crânio com auxílio de uma broca odontológica, direcionadas ao HV. Com o auxílio de uma seringa Halmiton 7634-01, 5 µL, Modelo 75 RN SYR conectada a uma agulha 33 gauge (Hamilton-7803- 05 Small Hub RN) foi microinjetado 0.3 microlitros, bilateralmente no Hipocampo Ventral, de DREADD hM4D acoplado a Gi fundido com mCherry sob o controle do promotor CaMKIIa (pAAV- CaMKIIa-hM4D(Gi)-mCherry; plasmídeo #50477, Addgene, Cambridge, MA, EUA). Como medida profilática, ao final da cirurgia os animais receberam 0,4 mL de pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e 0,4 mL do antiinflamatórionão-esteroidal flunixinameglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) pela via subcutânea.

4.3. Drogas e soluções utilizadas

As drogas utilizadas foram:

i. Lidocaína, anestésico local, administrada 3 μL por animal, via subcutânea;

ii. Pentabiótico (Fountora-Wyeth, Brasil), antibiótico, 560 mg/mL/kg, via intramuscular;

iii. Flunixina meglumina (Banamine ®, Schering Plough, Brasil), anti-inflamatório, 0,5 mg/mL/kg, via subcutânea;

iv. Cetamina, via intraperitonial, 87mg/kg, via intraperitonial;

v. Xilazina, via intraperitonial, 13mg/kg, via intraperitonial;

vi. CNO, Clozapina-N-Óxido, (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA), 2,5 mg/kg,via intraperitonial;

vii. DMSO, Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, EUA);

viii. Uretana (Sigma-Aldrich, EUA), anestésico, na dose de 1,2 g/kg, via intraperitoneal;

ix. Metilatropina, antagonista dos receptores muscarínicos, 3mg/mL, infusão intravenosa;

x. Atenolol, antagonista adrenérgico, 4mg/mL, via infusão intravenosa;

O antibiótico e o anti-inflamatório foram diluídos de acordo com as orientações do fabricante. As demais drogas foram dissolvidas em salina (NaCl 0,9%). As doses dos fármacos utilizados foram retiradas de estudos prévios da literatura (COSTA-FERREIRA, 2016; REIS, 2014; BUSNARDO, 2019; WIRTSHAFTER, 2016; WICKER, 2016; BUSNARDO, 2016; BUSNARDO, 2010).

4.4. Protocolos de estresse

4.4.1. Estresse de restrição

O estresse de restrição consistiu na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos

(diâmetro=6,5 cm, comprimento=15 cm, ventilados por buracos de $^{1}/_{2}$ polegada que preencham aproximadamente 20% do tubo) (BECHTOLD *et al*., 2009).

4.4.2. Estresse de restrição repetido (ERR) ou estresse crônico de restrição (do inglês, chronic restrain stress - CRS)

Para o ERR, os animais foram submetidos a sessões diárias de duas horas de estresse de restrição, durante um período de 21 dias consecutivos (BECHTOLD *et al*., 2009). As sessões de estresse foram realizadas no período da manhã.

4.5 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste de LCE foi conduzido como descrito por Padovan e colaboradores, e foi realizado 24h após a último dia de exposição ao estresse crônico. Resumidamente, o aparelho consistia de dois braços abertos opostos (50x10 cm) cruzadas em ângulo reto por dois braços fechados (50x10x40 com). O labirinto está localizado a 50 cm acima do chão. Foi avaliado a frequência de entrada e tempo de permanência nos braços abertos, fechados e centro, registrados por uma câmera conectada ao computador contendo um software Any Mazy TM (versão 4.7, Stoelting). (PADOVAN, 2000; BUSNARDO *et al*., 2013).

4.6 Teste do Campo Aberto

O dispositivo do campo aberto consiste de uma caixa circular de vidro (60 cm x 60 cm x 30 cm) com pouca iluminação. Vinte quatro horas (24h) após a última sessão de restrição e logo após o teste LCE, cada animal foi colocado na zona central no aparelho e seu comportamento foi registrado por uma câmera, em um período de 5 minutos, e avaliado pelo mesmo software Any Mazy TM (versão 4.7, Stoelting). (SPIACCI *et al*., 2016).

4.7 Teste do nado forçado (TNF)

Os animais foram submetidos em cilindros recobertos com papel pardo (50 cm de altura e 22 cm de diâmetro) com água em uma temperatura média de 25± 2°C, com uma profundidade de 30 cm de água. Os testes foram realizados durante um período de 5 minutos para cada animal e analisados pelos 3 minutos finais. Não foi realizado o pré-teste. O registro comportamental foi analisado a partir da natação e imobilidade . Durante esse período, o registro foi realizado através de uma webcam Logitech C920 HD PRO para filmagem e posterior análise. (SARTIM *et al*., 2016).

4.8 Teste Esguicho de Sacarose

O teste teve por objetivo analisar o autocuidado e a atividade de limpeza do animal. A atividade de limpeza em reposta a uma solução doce (solução de sacarose a 10%) é considerada como uma medida indireta da ingestão de solução palatável. A solução foi jorrada no revestimento dorsal do animal, com eles permanecendo em caixas individuais e filmados por um período de 5 minutos para registro. Foram avaliados na filmagem, a atividade de limpeza (nariz, rosto, cabeça e corpo). (AMINI *et al*., 2017).

4.9. Canulação da Artéria Femoral

Todos os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (87mg/kg) e xilazina (13mg/kg), injetada por via intraperitonial (0,1 ml para cada 100 g de pesos do animal) e foi implantado um cateter na artéria e veia femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares. Os cateteres foram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (20 U/mL de heparina em solução salina), e obstruídos com pino de metal. Após a implantação do cateter, o mesmo foi exteriorizado na região dorsal do animal e fixado à pele

por sutura cirúrgica. Ao término da cirurgia, os animais receberam 0,4 mL do anti-inflamatório não- esteroidal flunixinameglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) por via subcutânea para analgesia pós-operatória. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro cardiovascular (CRESTANI; ALVES *et al*., 2010).

5.0. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., EUA) através de um auxílio de um segmento de polietileno PE-50. A pressão arterial pulsátil (PAP) é registrada utilizando de um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, Australia), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30, ML866, ADInstruments, Australia), usando um programa apropriado (Lab Chart PRO, ADInstruments, Australia). Os valores de pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD), bem como a frequência cardíaca, foram obtidos a partir dos sinais da PAP (BUSNARDO *et al*., 2013).

5.1. Avaliação da atividade autonômica cardíaca e frequência cardíaca intrínseca (FCi).

Foram avaliadas a atividade autonômica cardíaca e a FCi pela administração intravenosa do antagonista dos receptores muscarínicos metilatropina (4 mg/mL) e do antagonista seletivo do receptores β1-adrenérgicos atenolol (3 mg/mL), administrados durante o protocolo de registro cardiovascular, injetadas por via intraperitonial (0,1 ml para cada 100 g de peso do animal). No primeiro dia, i a metilatropina foi administrada 30 minutos após a administração de Clozapina-N-Óxido (CNO, 2,5 mg/kg) ou salina (0,1mL para cada 100g de peso do animal) nos respectivos animais, 10 minutos depois foi feita a administração de atenolol. Por fim, os animais ficaram conectados ao registro

por um período de mais 10 minutos e, em seguida, retirados. Os animais voltaram para suas respectivas caixas e permaneceram na mesma sala. No segundo o dia, os animais receberam primeiramente atenolol e 10 minutos depois metilatropina, seguindo o mesmo protocolo do dia anterior. A atividade parassimpática foi determinada pela análise da alteração na FC basal causada pela metilatropina, enquanto a atividade simpática foi obtida a partir da resposta de FC causada pelo tratamento com atenolol. A iFC foi obtida após o tratamento combinado com atenolol e metilatropina no primeiro e segundo dias, e uma média dos dois valores foi calculada para cada animal (VIEIRA *et al*.,2018).

5.2. Perfusão dos Animais

Foram preparadas as soluções de 1x PBS, 4% de paraformaldeído (PFA) e 30% de sacarose (em PBS). Foi preparado aproximadamente 100 mL de PBS e 500 mL de PFA a 4% por rato. Após a preparação das soluções, os animais foram anestesiados com uretana, 1,2 g/kg, intraperitonealmente (i.p.). Com um auxílio de uma pinça hemostática, o processo xifóide foi exposto e a parede anterior do corpo levantada.

Os músculos abdominais ao longo da margem inferior das costelas e o diafragma ao longo de sua fixação às margens ventral e lateral da caixa torácica foram cortados. A parte lateral da caixa torácica em ambos os lados até a clavícula foi cortada. Usando uma tesoura, foi feito um corte transversal através do aspecto posterior esquerdo do coração para abrir o ventrículo esquerdo do rato (no vértice do coração). Após confirmar o posicionamento da ponta da agulha, foi feito uma pequena incisão no átrio direito para fazer uma saída. Em seguida, a bomba de perfusão foi ligada e perfundiu-se PBS no animal a uma taxa de fluxo de 20 mL/min. Uma vez que o PBS substituiu o sangue no sistema vascular do animal e o fluido que escapa do átrio estava claro, a entrada da bomba do PBS foi transferida para a solução de PFA a 4%. Posteriormente, os animais foram decapitados e os encéfalos removidos. Os cérebros foram

pós-fixados por imersão em 4% PFA por 1-4 horas e transferidos para um pequeno recipiente contendo 30% de solução de sacarose diluída em PBS. Os cérebros permaneceram nesta solução de sacarose a 4°C até afundar em torno de 2 a 3 dias. A partir disso, os cérebros foram armazenados a -80°C até uso posterior. (GOMES *et al*., 2020).

5.3.Análise Estatística

Os dados comportamentais foram expressos como media ± erro padrão da media (EPM) e foram analisados utilizando a análise de variância unifatorial (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. O nível de significância assumido para todos os testes foi de $p<0,05$.

5.4. Imunofluorescência

As seções coronais dos cérebros congelados foram cortadas em fatias de 40 μm usando um criostato (HM 560, Thermo Scientific, Walldorf, Alemanha) e o tecido foi armazenado a -20°C. As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos e depois reidratadas com PBS. A expressão dos vírus pAAV5-hM4D(Gi)-CaKIIa-mCherry foi confirmada pela expressão positiva de mCherry nos neurônios glutamatérgicos no HV. As imagens foram capturadas e examinadas em microscópio de Fluorescência (Leica Biosystems, Illinois, EUA). Foi utilizado o seguinte filtro: mCherry: excitação 650 nm e emissão: 673 nm; A expressão do pAAV5-CaKIIa-GFP foi confirmada pela expressão positiva de GFP nos neurônios glutamatérgicos no HV. As imagens foram capturadas e examinadas em microscópio de Fluorescência (Leica Biosystems, Illinois, EUA). Foram utilizados os seguintes filtros: EGFP: excitação 488 nm e emissão: 509 nm.

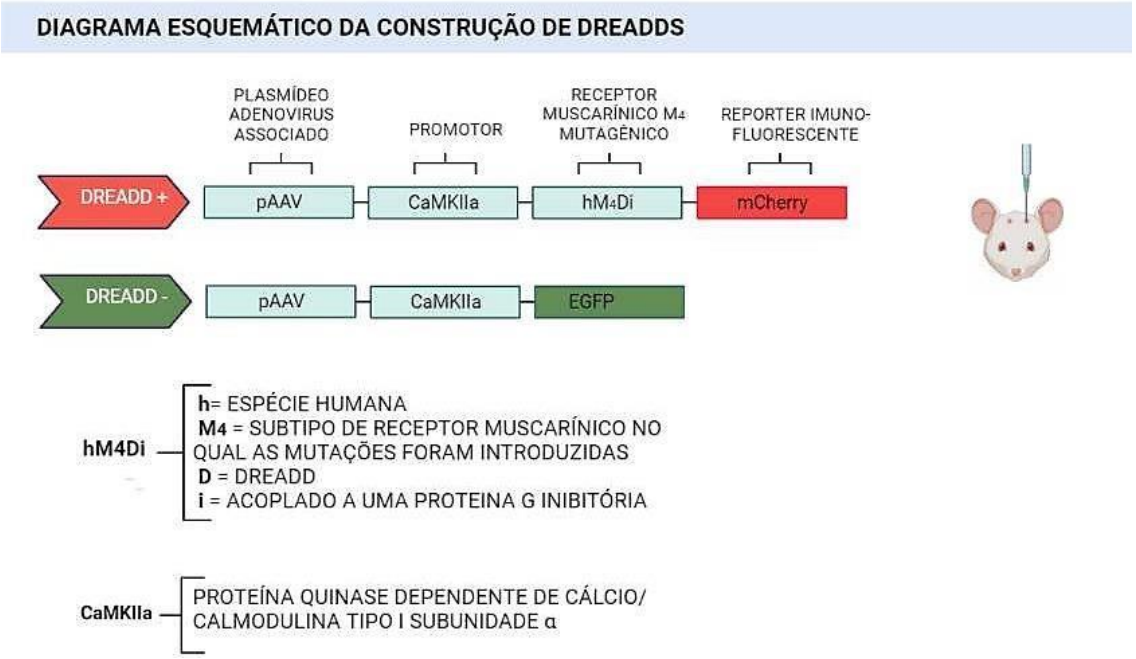


Figura 4 : Diagrama esquemático da construção de DREADDs. Criado pelo BioRender.

6. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

6.1 Efeito da inativação de neurônios glutamatérgicos do HV por meio da técnica de DREADD durante um protocolo de estresse crônico repetido sobre os parâmetros cardiovasculares basais e a atividade autonômica cardíaca.

Este protocolo teve o objetivo de investigar o efeito da inativação de neurônios glutamatérgicos do HV por meio da técnica de DREADD+ sobre as alterações cardiovasculares basais (PAM e FC), autonômica cardíaca (FC intrínseca, atividade simpática e parassimpática cardíaca) em condições de repouso causadas por um protocolo de estresse crônico repetido. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: **1) DREADD +/veiculo (salina, 0,1mL para 100g de peso do animal)**, onde os animais cronicamente estressados receberam salina (NaCl 0,9% i.p) 30 minutos antes do registro cardiovascular e **2) DREADD+/CNO (2,5mg/kg)** onde os animais cronicamente estressados receberam CNO 30 minutos antes do registro cardiovascular. Os dois grupos foram submetidos a sessões diárias de 2h de estresse durante 21 dias consecutivos. Os testes para avaliação da função cardiovascular e atividade autonômica cardíaca em condições basais foram realizados no 3° e 4° dias após a última sessãode estresse. Para a avaliação da função cardiovascular e atividade autônoma em condições basais, os animais, previamente injetados com salina ou CNO, foram conectados individualmente ao sistema de registro cardiovascular e submetidos a um período de 30 minutos de registro cardiovascular. Os animais receberam administração intravenosa de metilatropina e atenolol para determinação da atividade autonômica cardíaca. No segundo dia, os animais foram tratados com metilatropina e atenolol na sequência oposta ao realizado no primeiro dia. No final dos experimentos, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico (uretana, 250 mg / mL / 200 g de peso corporal, i.p.) e o cérebrofoi retirado via perfusão.

6.2 Efeito da inativação de neurônios glutamatérgicos do HV por meio da técnica de DREADD durante um protocolo de estresse crônico repetido sobre as respostas comportamentais.

Este protocolo teve o objetivo de investigar o efeito da inativação de neurônios glutamatérgicos do HV por meio da técnica de DREADD+ sobre as alterações comportamentais (efeitos do tipo ansiogênico e depressivo) causadas por um protocolo de estresse crônico repetido. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: **1) Naives**, onde os animais não foram estressados e permaneceram no biotério sem serem perturbados, exceto no período de limpeza das caixas; **2) DREADD+/veiculo** (salina, 0,1 mL para cada 100g de peso do animals), onde os animais cronicamente estressados receberam por via intraperitoneal salina (NaCl 0,9% i.p), 30 minutos antes dos testes comportamentais e **3) DREADD+/CNO (2,5mg/kg)** onde os animais cronicamente estressados receberam por via intraperitoneal CNO, 30 minutos antes dos testes comportamentais. Os dois grupos estressados foram submetidos a sessões diárias de 2h de estresse durante 21 dias consecutivos. 24h e 48h após a última sessão de estresse foram realizados, respectivamente, os testes comportamentais relacionados à ansiedade e à depressão. As consequências emocionais induzidas pelo CRS, foram avaliadas através dos testes:Teste de Labirinto em Cruz Elevado e Campo Aberto para avaliação de comportamentos relacionados a ansiedade; e Teste de Nado Forçado e o Teste de Esguicho de Sacarose para avaliação de comportamentos relacionados a depressão.

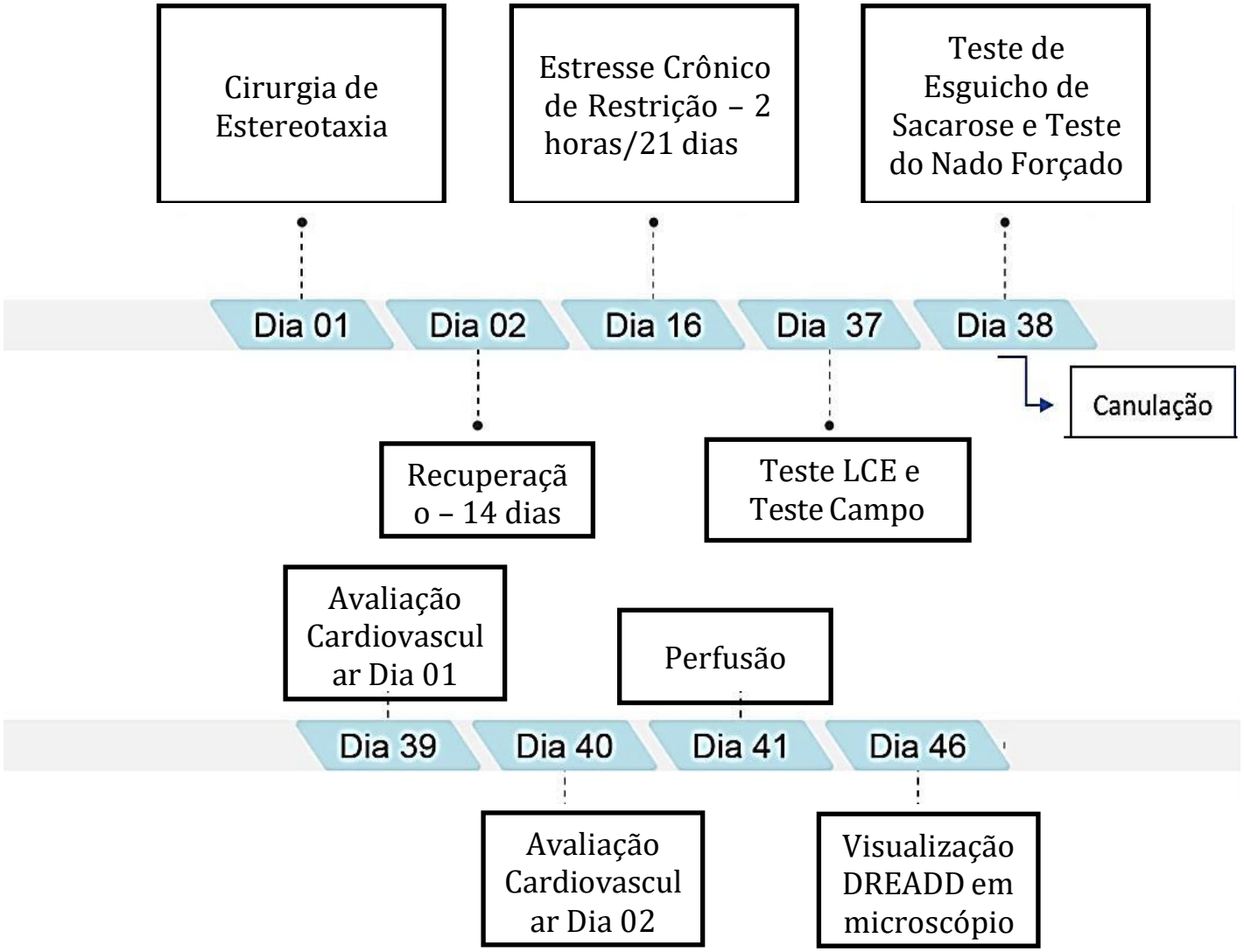


Figura 5: Desenho experimental representado pelo protocolo utilizado em animais DREADDs (+). A droga CNO foi administrada via intraperitonealmente 30 minutos antes dos testes comportamentais e avaliação cardiovascular . Desenho criado pelo BioRender.

- Labirinto em cruz elevado (LCE) - Avaliar o efeito preditivo de fármacos ansiolíticos.
- Teste do Campo Aberto - Avaliar o efeito preditivo de fármacos e ansiolíticos.
- Teste do Nado Forçado - Avaliar o efeito preditivo de fármacos antidepressivos.
- Teste Esguicho de Sacarose - Avaliar o efeito preditivo de fármacos antidepressivos.

Avaliação Cardiovascular 1:

- Registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).
- Avaliação da atividade autonômica cardíaca e frequência cardíaca intrínseca pela administração intravenosa (i.v.) de metilatropina e atenolol.

Avaliação Cardiovascular 2:

- Avaliação da atividade autonômica cardíaca e frequência cardíaca intrínseca pela administração i.v. de atenolol e metilatropina (administração inversa ao primeiro dia).

6.3 Efeito inespecífico do CNO nos animais DREADD- durante um protocolo de estresse agudo sobre os parâmetros cardiovasculares basais e a atividade autonômica cardíaca.

Este protocolo teve o objetivo de investigar o efeito inespecífico do CNO nos animais DREADD- sobre as alterações cardiovasculares basais (PAM e FC), autonômica cardíaca (FC intrínseca, atividade simpática e parassimpática cardíaca) em condições de repouso causadas por um protocolo de estresse agudo de restrição. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: **1) DREADD -/veiculo (salina, 0,1mL para 100g de peso do animal)**, onde os animais agudamente estressados receberam salina (NaCl 0,9% i.p) 30 minutos antes do registro cardiovascular e **2) DREADD-/CNO (2,5mg/kg)** onde os animais agudamente estressados receberam CNO 30 minutos antes do registro cardiovascular. Os dois grupos foram submetidos a uma única sessão de 2h de estresse no dia anterior aos testes comportamentais, ou seja, os testes para avaliação da função cardiovascular e atividade autonômica cardíaca em condições basais foram realizados no 3° e 4° dias após a sessão de estresse. Para a avaliação da função cardiovascular e atividade autonômica cardíaca em condições basais, os animais previamente injetados com salina ou CNO, foram conectados individualmente ao sistema de registro cardiovascular e submetidos a um período de 30 minutos de registro cardiovascular.

Os animais receberam administração intravenosa de metilatropina e atenolol para determinação da atividade autonômica cardíaca. No segundo dia, os animais foram tratados com metilatropina e atenolol na sequência oposta ao realizado no primeiro dia. No final dos experimentos, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico (uretana, 250 mg / mL / 200 g de peso corporal, i.p.) e o cérebro foi retirado via perfusão.

6.4 Efeito inespecífico do CNO nos animais DREADD- durante um protocolo se estresse agudo sobre as respostas comportamentais.

Este protocolo teve o objetivo de investigar o efeito inespecífico do CNO nos animais DREADD- sobre as alterações comportamentais (efeitos do tipo ansiogênico e depressivo) causadas por um protocolo de estresse agudo de restrição. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: **1) Naives**, onde os animais não foram estressados e permaneceram no biotério sem serem perturbados, exceto no período de limpeza das caixas; **2) DREADD-/veiculo** (salina, 0,1 mL para cada 100g de peso do animals), onde os animais agudamente estressados receberam por via intraperitoneal salina (NaCl 0,9% i.p), 30 minutos antes dos testes comportamentais e **3) DREADD-/CNO (2,5mg/kg)** onde os animais agudamente estressados receberam por via intraperitoneal CNO, 30 minutos antes dos testes comportamentais. Os dois grupos estressados foram submetidos a uma sessão de estresse por restrição de 2 horas. 24h e 48h após a sessão de estresse foram realizados, respectivamente, os testes comportamentais relacionados à ansiedade e à depressão. As consequências emocionais, foram avaliadas através dos testes: Teste de Labirinto em Cruz Elevado e Teste de Campo Aberto para avaliação de comportamentos relacionados a ansiedade; e Teste de Nado Forçado e o teste de Esguicho de Sacarose para avaliação de comportamentos relacionados a depressão.

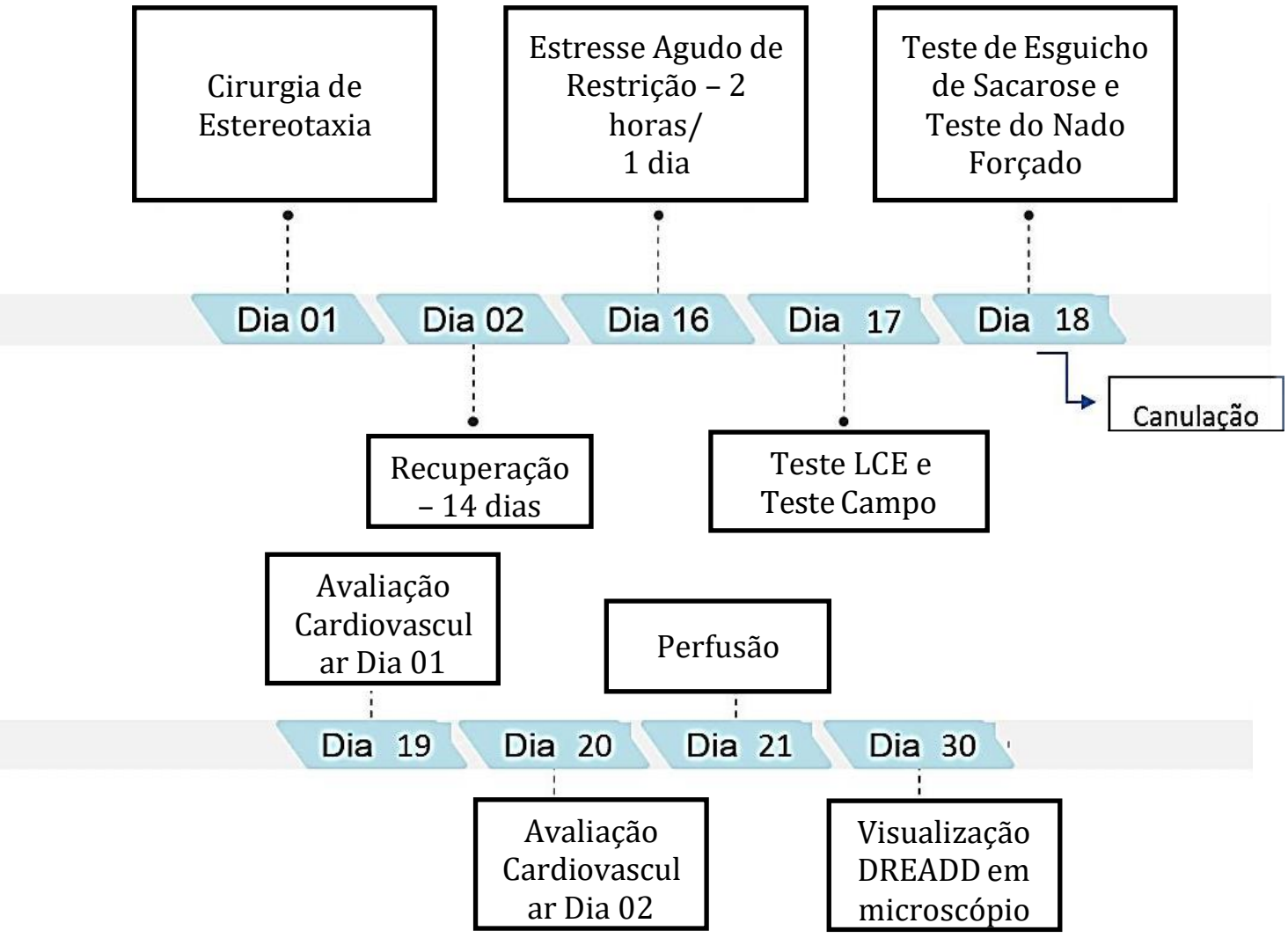


Figura 6: Desenho experimental representado pelo protocolo utilizado em animais DREADDs (+). A droga CNO foi administrada via intraperitonealmente 30 minutos antes dos testes comportamentais e avaliação cardiovascular . Desenho criado pelo BioRender.

- Labirinto em cruz elevado (LCE) - Avaliar o efeito preditivo de fármacos ansiolíticos.
- Teste do Campo Aberto - Avaliar o efeito preditivo de fármacos e ansiolíticos.
- Teste do Nado Forçado - Avaliar o efeito preditivo de fármacos antidepressivos.
- Teste Esguicho de Sacarose - Avaliar o efeito preditivo de fármacos antidepressivos.

Avaliação Cardiovascular - Dia 01:

- Registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).
- Avaliação da atividade autonômica cardíaca e frequência cardíaca intrínseca pela administração intravenosa (i.v.) de metilatropina e atenolol.

Avaliação Cardiovascular - Dia 02:

- Avaliação da atividade autonômica cardíaca e frequência cardíaca intrínseca pela administração i.v. de atenolol e metilatropina (administração inversa ao primeiro dia).

7. RESULTADOS

7.1 Expressão do DREADD hM4Di mCherry no hipocampo ventral (HV)

Uma figura representativa do grupo DREADD (+) indicando a expressão do DREADD hM4Di no hipocampo ventral (HV) pode ser vista na Figura 7.

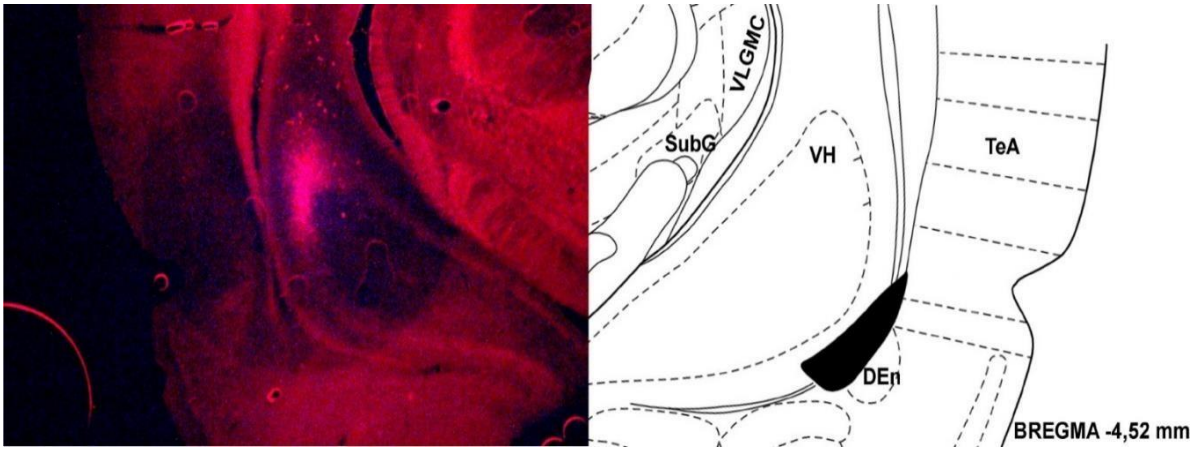


Figura 7: Imagens indicando os locais de injeção de DREADD (+) (AVV5-CaMKIIa-Hm4Di-Mcherry) no Hipocampo Ventral (VH). DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) representa o núcleo da célula (azul). Foto à esquerda: Objetiva 5x. Foto a direita: representacao de acordo com Atlas de Paxinos e Watson. Microscópio de Fluorescência (Leica Biosystems, Illinois, EUA).

7.2 Efeito da inativação de neurônios glutamatérgicos do HV por meio da técnica de DREADD durante um protocolo de estresse de restrição crônico sobre os parâmetros cardiovasculares basais e a atividade autonômica cardíaca.

Parâmetros cardiovasculares basais : Os ratos DREADD+ submetidos ao estresse crônico de restrição e que foram tratados com veículo (n= 8) ou CNO (n= 10) e animais naive (n= 8) não apresentaram alterações significativas nos valores basais de FC (F (2, 23) =1.565, p= 0.2305). No entanto, os ratos DREADD+ submetidos ao estresse crônico de restrição e que foram tratados com veículo apresentaram um aumento na PAM basal quando comparados com os animais não estressados (naives) (F (2, 23) = 4.599, p = 0.0209) (Figura 8).

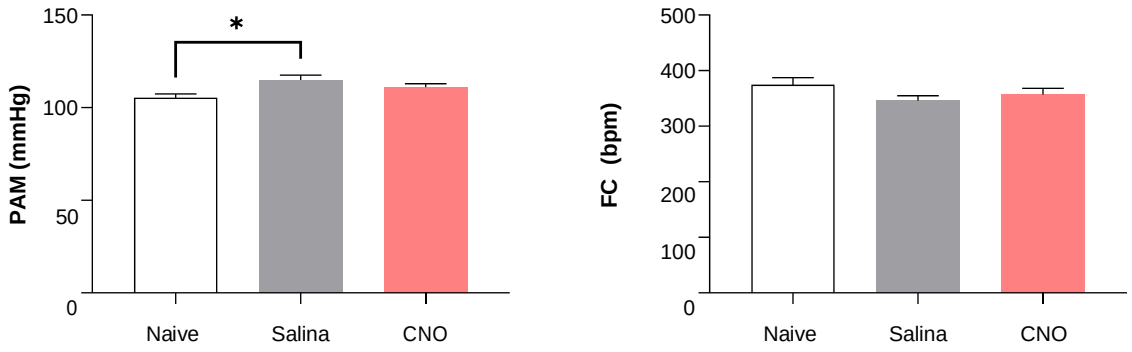


Figura 8 - Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM) e frequência Cardíaca (FC) dos animais não estressados (naive, barras brancas, n=8) e dos animais DREADD+ submetidos ao estresse crônico de restrição e que foram tratados com veículo (95% NaCl 0,9% e 5% DMSO, 0,1mL/100g, barras cinzas, n=8) ou Clozapina-N-Óxido (CNO, 2,5mg/kg, barras vermelhas, n=10). O tratamento farmacológico foi realizado 30 minutos antes do início da avaliação cardiovascular. As colunas representam as médias ± EPM. ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Atividade autonômica cardíaca e FC intrínseca.

Atividade simpática cardíaca: A análise da variação da FC induzida pela administração intravenosa de atenolol (bloqueador da atividade simpática) não indicou um efeito significativo entre ratos DREADD+ submetidos ao estresse crônico de restrição que foram tratados com veículo (n=5) ou CNO (n=9) e animais naive (n= 7) (F (2, 17) = 0.7167, P=0.5025) Figura 9.

Atividade parassimpática cardíaca: A análise da variação da FC induzida pela administração intravenosa de metilatropina (bloqueador da atividade parassimpática) não indicou um efeito significativo entre ratos DREADD+ submetidos ao estresse crônico de restrição e que foram tratados com veículo (n=6) ou CNO (n=9) e animais naive (n= 8) (F (2, 18) = 0.3623, P=0.7010) Figura 9.

FC intrínseca: A análise dos valores de FC após o tratamento combinado com Atenolol e Metilatropina (FCi) não indicou efeito significativo entre os animais tratados com veículo (n=8) ou CNO (n=10) e animais naive (n=7) (F (2, 21) = 3.343, P= 0.0549) Figura 9.

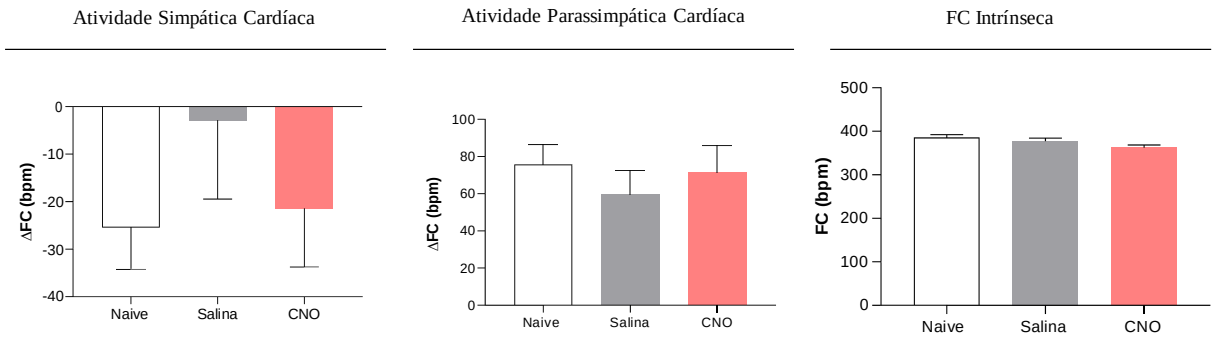


Figura 9 – Atividade autonômica cardíaca e Frequência cardíaca intrínseca (FCi) dos animais não estressados (naive, barras brancas, n=7) e dos animais DREADD+ submetidos ao estresse crônico de restrição e que foram tratados com veículo (95% NaCl 0,9% e 5% DMSO, 0,1mL/100g, barras cinzas, n=5) ou Clozapina-N-Óxido (CNO, 2,5mg/kg, barras vermelhas, n=9). O tratamento farmacológico foi realizado 30 minutos antes do início da avaliação cardiovascular. As colunas representam as médias ± EPM. ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

7.3 Efeito da inativação de neurônios glutamatérgicos do HV por meio da técnica de DREADD durante um protocolo de estresse crônico repetido sobre as respostas comportamentais.

LCE: A análise do número de entradas no braços abertos (F (2, 26) = 0.6620 , P=0.5243) bem como do tempo gasto nos braços abertos (F (2, 26) = 0.2488, P=0.7815) não indicou diferença significativa entre os grupos não estressado (naive, n=10) e grupos cronicamente estressados DREADD+ e tratados com veículo (n=10) ou CNO (n=9). A análise do número de entradas nos braços fechados (F (2, 26) = 0.9193, P=0.4114) do LCE também näo indicou diferença entre os grupos experimentais avaliados.

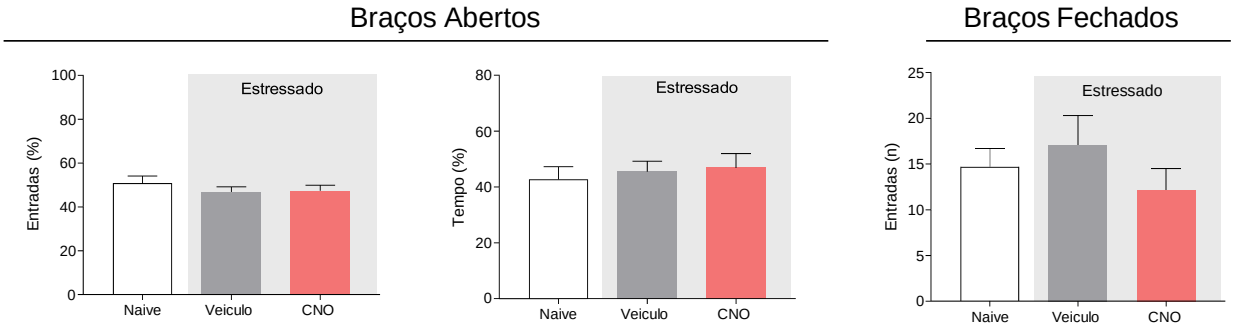


Figura 10: Parâmetros comportamentais avaliados durante a exploração do labirinto em cruz elevado (LCE) por cinco minutos dos animais não estressados (naive, barras brancas, n=10) e dos animais DREADD+ submetidos ao estresse crônico de restrição e que foram tratados com veículo (95% NaCl 0,9% e 5% DMSO, 0,1mL/100g, barras cinzas, n=10) ou Clozapina-N-Óxido (CNO, 2,5mg/kg, barras vermelhas, n=9). O tratamento farmacológico foi realizado 30 minutos antes do início do teste LCE. As colunas representam as médias ± EPM. ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Campo Aberto: A análise da distância percorrida no teste do Campo Aberto (OFT) (F (2, 26) = 1,268, P=0,2983) não indicou diferença significativa entre os grupos não estressado (naive, n=10) e grupos cronicamente estressados DREADD+ e tratados com veículo (n=10) ou CNO (n=9). A análise do tempo gasto no centro da arena (F (2, 26) = 6,847, P=0,0041) indicou diferença significativa entre os grupos não estressado (naive) e grupos cronicamente estressados DREADD+ e tratados com veículo ou CNO. O pós-teste indicou que animais cronicamente estressados DREADD+ e tratados com veículo apresentaram um tempo gasto maior no centro da arena quando comparados com os animais do grupo naive (P<0,01). Além disso, animais cronicamente estressados DREADD+ e tratados com CNO apresentaram um tempo gasto maior no centro da arena quando comparados com os animais do grupo veículo (P<0,01). A análise no tempo gasto na periferia (F (2, 26) = 5,519, P=0,0100) indicou diferença significativa entre os grupos não estressado (naive) e grupos cronicamente estressados DREADD+ e tratados com veículo ou CNO. O pós-teste indicou que animais naive permaneceram um tempo maior na periferia quando comparados aos animais cronicamente estressados DREADD+ tratados com veículo (P<0,05).

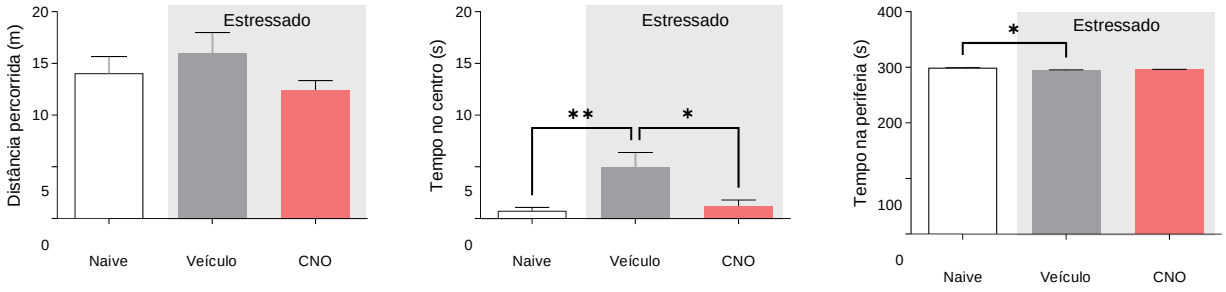


Figura 11: Parâmetros comportamentais avaliados durante a exploração do Campo Aberto por cinco minutos dos animais não estressados (naive, barras brancas, n=10) e dos animais DREADD+ submetidos ao estresse crônico de restrição e que foram tratados com veículo (95% NaCl 0,9% e 5% DMSO, 0,1mL/100g, barras cinzas, n=10) ou Clozapina-N-Óxido (CNO, 2,5mg/kg, barras vermelhas, n=9). O tratamento farmacológico foi realizado 30 minutos antes do início do teste do LCE. As colunas representam as médias ± EPM. *P<0,05 ** P<0,01. ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Esguicho de Sacarose: A análise do tempo de autolimpeza (“Grooming”) (F (2, 35) = 1,895, P=0,1654) e a latência para o início do primeiro gromming (F (2, 35) = 1,977, P=0,1491) não indicou diferença significativa entre os grupos não estressado (naive, n=10) e grupos cronicamente estressados DREADD+ e tratados com veículo (n=15) ou CNO (n=13).

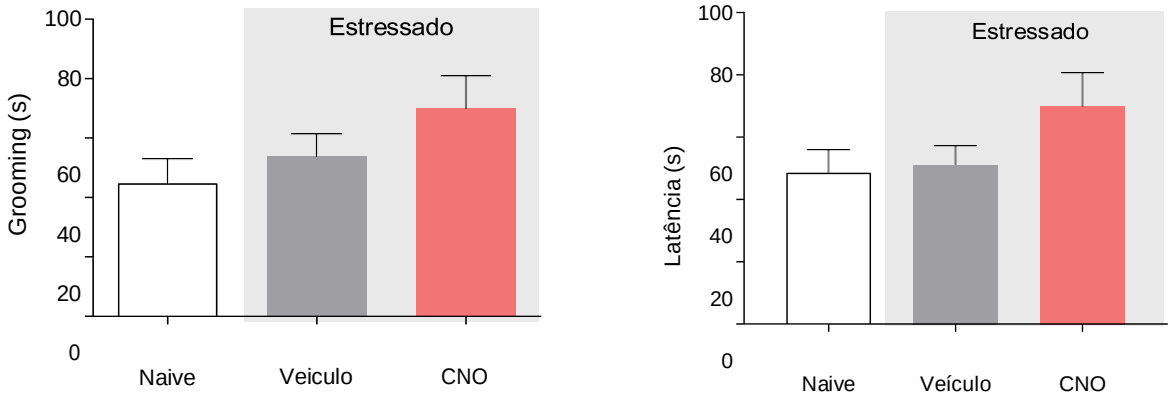


Figura 12: Parâmetros comportamentais avaliados durante o teste de esguicho de sacarose realizado em um período de cinco minutos dos animais não estressados (naive, barras brancas, n=10) e dos animais DREADD+ submetidos ao estresse crônico de restrição e que foram tratados com veículo (95% NaCl 0,9% e 5% DMSO, 0,1mL/100g, barras cinzas, n=15) ou Clozapina-N-Óxido (CNO, 2,5mg/kg, barras vermelhas, n=13). O tratamento farmacológico foi realizado 30 minutos antes do início do teste de esguicho de sacarose. As colunas representam as médias ± EPM. *P<0,05 ** P<0,01. ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

TNF: A análise do nado (F (2, 51) = 1,193, P=0,3115) e da imobilidade (F (2, 51) = 2,070, P=0,1366) no Teste do Nado Forçado não indicou diferença significativa entre os grupos não estressado (naive, n=19) e grupos cronicamente estressados DREADD+ e tratados com veículo (n=18) ou CNO (n=17).

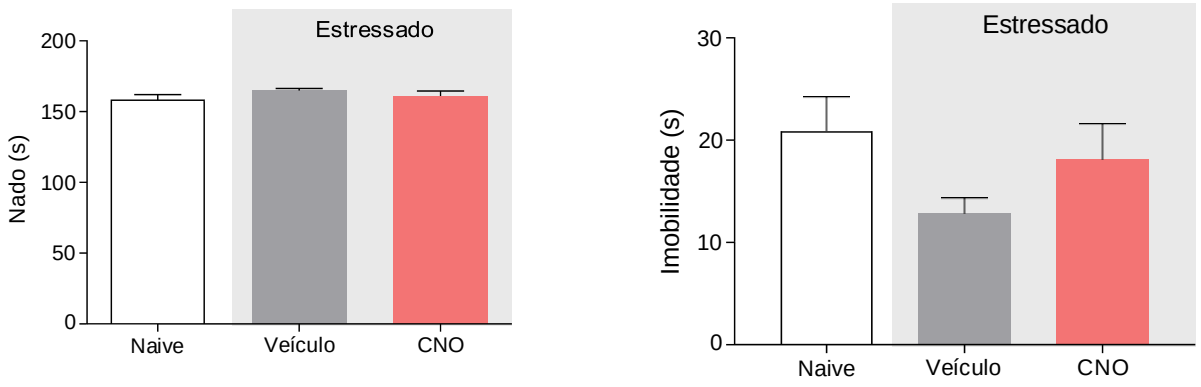


Figura 13: Parâmetros comportamentais avaliados durante o teste de nado forçado realizado em um período de três minutos dos animais não estressados (naive, barras brancas, n=19) e dos animais DREADD+ submetidos ao estresse crônico de restrição e que foram tratados com veículo (95% NaCl 0,9% e 5% DMSO, 0,1mL/100g, barras cinzas, n=18) ou Clozapina-N-Óxido (CNO, 2,5mg/kg, barras vermelhas, n=17). O tratamento farmacológico foi realizado 30 minutos antes do início do teste de esguicho de sacarose. As colunas representam as médias ± EPM. ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

7.4 Expressão do DREADD (-) no hipocampo ventral (HV)

Uma figura representativa do grupo DREADD (-) indicando a expressão da proteína verde fluorescente (GFP) no hipocampo ventral (HV) pode ser vista na figura.

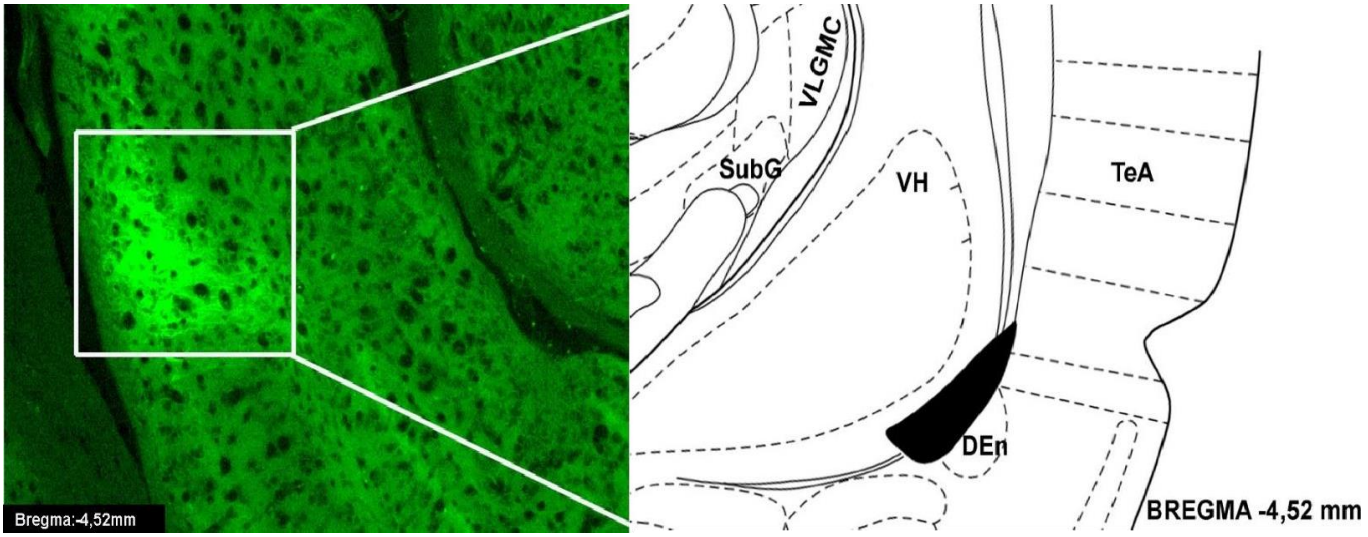


Figura 14: Imagens indicando os locais de injeção de DREADD (-) (AVV5-CaMKIIa-GFP) no Hipocampo Ventral (VH). DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) representa o núcleo da célula (azul). Foto à esquerda: Objetiva 5x Foto a direita: representacao de acordo com Atlas de Paxinos e Watson. Microscópio de Fluorescência (Leica Biosystems, Illinois, EUA). Microscópio de Fluorescência (Leica Biosystems, Illinois, EUA).

7.5 Efeito inespecífico do CNO nos animais DREADD- durante um protocolo de estresse de restrição agudo sobre os parâmetros cardiovasculares basais e a atividade autonômica cardíaca.

Parâmetros cardiovasculares basais : Os ratos DREADD- submetidos ao estresse agudo de restrição e que foram tratados com veículo (n= 7) ou CNO (n= 8) e os animais naive (n= 8) não apresentaram alterações significativas nos valores basais de frequência cardíaca – FC (F (2, 20) = 0.5890, P= 0.5642) e de pressão arterial média – PAM (F (2, 20) = 0.06256, P = 0.9395) (Figura 15).

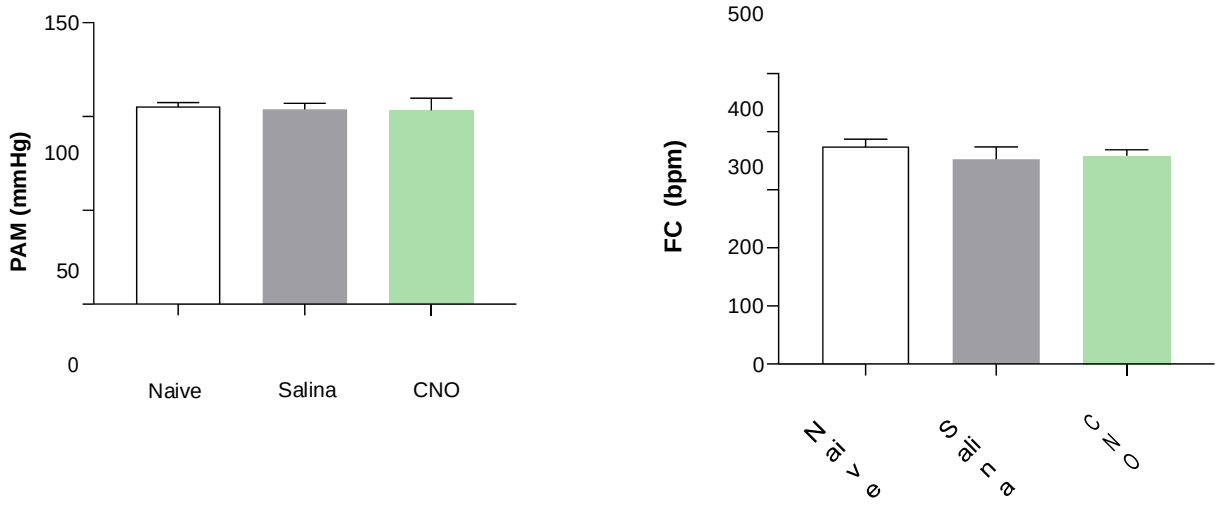


Figura 15 - Parâmetros basais da pressão arterial média (PAM) e da frequência Cardíaca (FC) dos animais não estressados (naive, barras brancas, n=8) e dos animais DREADD- submetidos ao estresse agudo de restrição e que foram tratados com veículo (95% NaCl 0,9% e 5% DMSO, 0,1mL/100g, barras cinzas, n=7) ou Clozapina-N-Óxido (CNO, 2,5mg/kg, barras vermelhas, n=8). O tratamento farmacológico foi realizado 30 minutos antes do início da avaliação cardiovascular. As colunas representam as médias ± EPM. ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Atividade autonômica cardíaca e FC intrínseca.

Atividade simpática cardíaca: A análise da variação da FC induzida pela administração intravenosa de atenolol (bloqueador da atividade simpática) não indicou um efeito significativo entre ratos DREADD- submetidos ao estresse agudo de restrição que foram tratados com veículo (n=7) ou CNO (n=8) e os animais naive (n= 7) ($F (2, 16) = 4.769$, $P=0.0237$) Figura 16.

Atividade parassimpática cardíaca: A análise da variação da FC induzida pela administração intravenosa de metilatropina (bloqueador da atividade parassimpática) não indicou um efeito significativo entre ratos DREADD- submetidos ao estresse agudo de restrição e que foram tratados com veículo (n=7) ou CNO (n=5) e os animais naive (n= 8) ($F (2, 17) = 1.598$, $P=0.2312$) Figura 16.

FC intrínseca: A análise dos valores de FC após o tratamento combinado com Atenolol e Metilatropina (FCi) não indicou efeito significativo entre os ratos DREADD- submetidos ao estresse agudo de restrição e que foram tratados com veículo (n=7) ou CNO (n=8) e os animais naive (n=7) ($F (2, 19) = 1.546$, $P= 0.2388$) Figura 16.

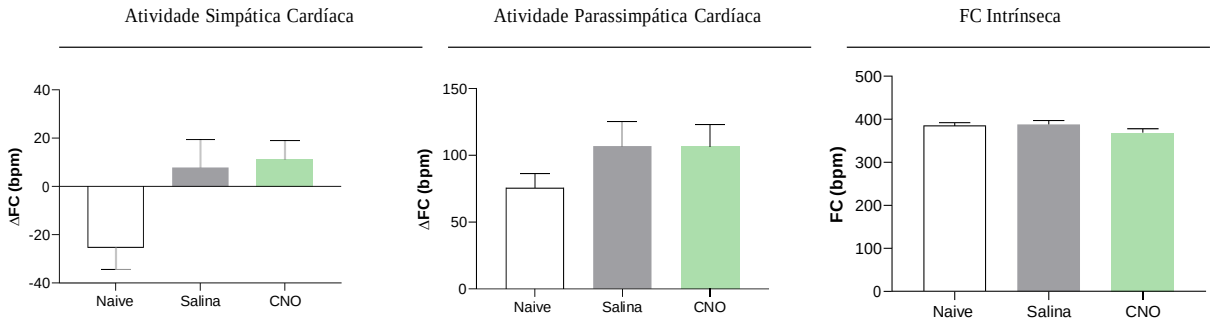


Figura 16 - Atividade autonômica cardíaca e Frequência cardíaca intrínseca (FCi) dos animais não estressados (naive, barras brancas, n=7) e dos animais DREADD- submetidos ao estresse agudo de restrição e que foram tratados com veículo (95% NaCl 0,9% e 5% DMSO, 0,1mL/100g, barras cinzas, n=7) ou Clozapina-N-Óxido (CNO, 2,5mg/kg, barras vermelhas, n=8). O tratamento farmacológico foi realizado 30 minutos antes do início da avaliação cardiovascular. As colunas representam as médias ± EPM. ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

7.6 Efeito inespecífico do CNO nos animais DREADD- durante um protocolo de estresse agudo sobre as respostas comportamentais.

LCE: A análise do número de entradas nos braços abertos do LCE indicou diferença significativa entre os grupos não estressado (naive, n=9) e grupos agudamente estressados DREADD- e tratados com veículo (n=8) ou CNO (n=11) (F (2, 25) = 4.405, P=0.0230). O pós-teste indicou que houve uma diminuição do número de entradas nos braços abertos dos animais DREADD- submetidos ao estresse agudo de restrição e tratados com veículo quando comparados com os animias não estressados (naive) (P<0,05). A análise do tempo gasto nos braços abertos do LCE não indicou diferença entre os grupos experimentais avaliados (F (2,25) = 3.362, P=0.0509). A análise do número de entrada dos braços fechados do LCE não indicou diferença entre os grupos experimentais avaliados (F (2, 25) = 6.846, P=0.0043).

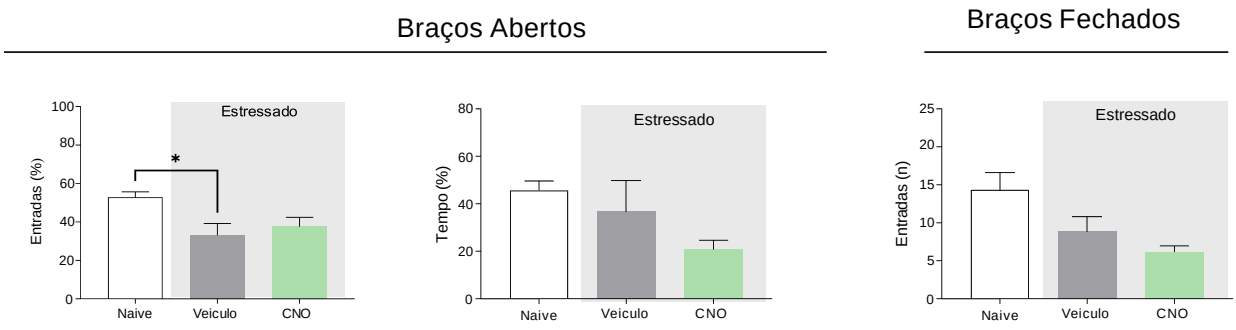


Figura 17: Parâmetros comportamentais avaliados durante a exploração do labirinto em cruz elevado (LCE) por cinco minutos dos animais não estressados (naive, barras brancas, n=9) e dos animais DREADD+ submetidos ao estresse crônico de restrição e que foram tratados com veículo (95% NaCl 0,9% e 5% DMSO, 0,1mL/100g, barras cinzas, n=8) ou Clozapina-N-Óxido (CNO, 2,5mg/kg, barras vermelhas, n=11). O tratamento farmacológico foi realizado 30 minutos antes do início do teste LCE. As colunas representam as médias ± EPM. ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Campo Aberto: A análise distância percorrida (F (2, 35) = 1,479, P=0,2418), do tempo gasto no centro (F (2, 35) = 3,274, P=0,0497) e do tempo gasto na periferia (F (2, 37) = 2,063, P=0,1414) no teste do Campos Aberto (OFT) não indicou diferença significativa entre os grupos não estressado (naive, n=10) e grupos agudamente estressados DREADD- e tratados com veículo (n=11) ou CNO (n=17).

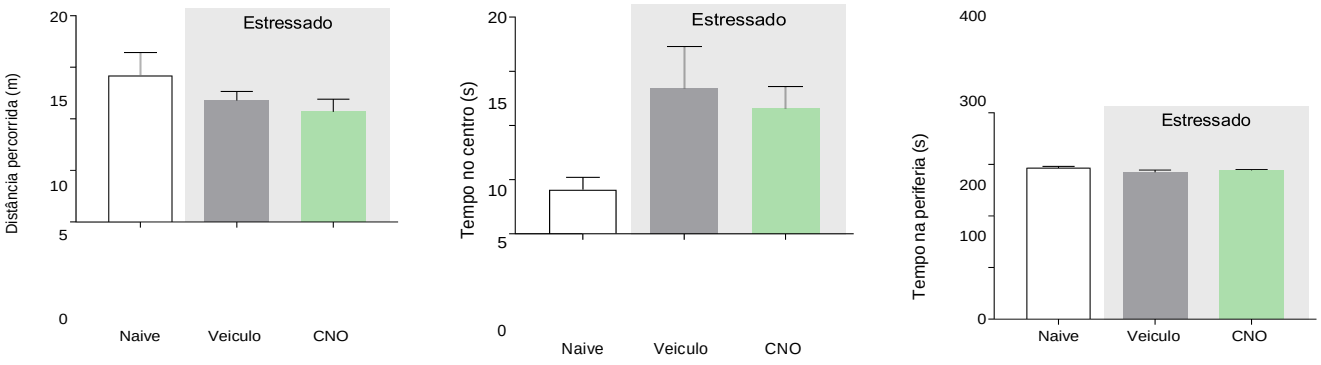


Figura 18: Parâmetros comportamentais avaliados durante a exploração do Campo Aberto por cinco minutos dos animais não estressados (naive, barras brancas, n=10) e dos animais DREADD+ submetidos ao estresse crônico de restrição e que foram tratados com veículo (95% NaCl 0,9% e 5% DMSO, 0,1mL/100g, barras cinzas, n=11) ou Clozapina-N-Óxido (CNO, 2,5mg/kg, barras vermelhas, n=17). O tratamento farmacológico foi realizado 30 minutos antes do início do teste LCE. As colunas representam as médias ± EPM. *P<0,05 ** P<0,01. ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Esguicho de Sacarose: A análise do tempo de autolimpeza (“Grooming”) F (2, 36) = 0,08262,P=0,9209) e a latência para o início do primeiro gromming (F (2, 36) = 0,6560, P=0,5237) não indicou diferença significativa entre os grupos não estressado (naive, n=10) e grupos agudamente estressados DREADD- e tratados com veículo (n=11) ou CNO (n=18).

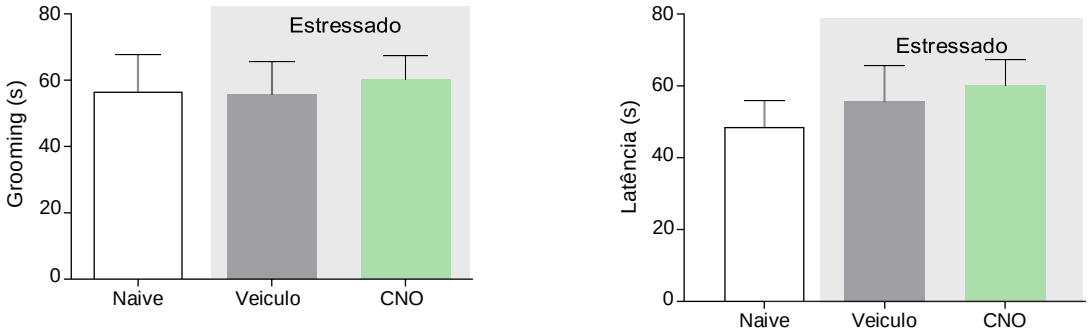


Figura 19: Parâmetros comportamentais avaliados durante o teste do esguicho de sacarose (Splash Test-ST) realizado em um período de cinco minutos dos animais não estressados (naive, barras brancas, n=10) e dos animais DREADD+ submetidos ao estresse crônico de restrição e que foram tratados com veículo (95% NaCl 0,9% e 5% DMSO, 0,1mL/100g, barras cinzas, n=11) ou Clozapina-N-Óxido (CNO, 2,5mg/kg, barras vermelhas, n=18). O tratamento farmacológico foi realizado 30 minutos antes do início do teste do esguicho de sacarose. As colunas representam as médias ± EPM. ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

TNF: A análise do nado (F (2, 42) = 1,170, P=0,3204) e da imobilidade (F (2, 42) = 1,257, P=0,2951) no Teste do Nado Forçado não indicou diferença significativa entre os grupos não estressado (naive, n=19) e grupos agudamente estressados DREADD- e tratados com veículo (n=10) ou CNO (n=16).

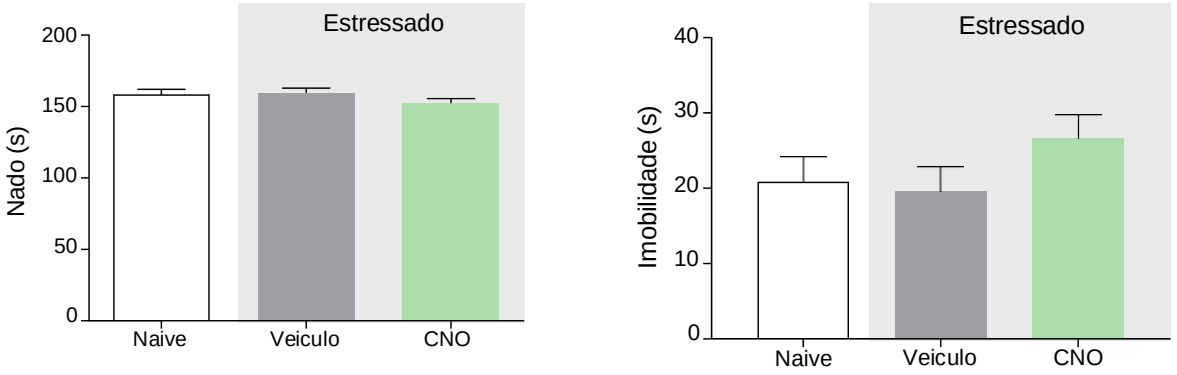


Figura 20: Parâmetros comportamentais avaliados durante o teste de nado forçado por três minutos dos animais não estressados (naive, barras brancas, n=10) e dos animais DREADD+ submetidos ao estresse crônico de restrição e que foram tratados com veículo (95% NaCl 0,9% e 5% DMSO, 0,1mL/100g, barras cinzas, n=11) ou Clozapina-N-Óxido (CNO, 2,5mg/kg, barras vermelhas, n=18). O tratamento farmacológico foi realizado 30 minutos antes do início do teste do esguicho de sacarose. As colunas representam as médias ± EPM. ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

8. DISCUSSÃO

No presente estudo, nós mostramos que os animais DREADD+ tratados com veículo e submetidos ao CRS apresentaram um aumento na PAM basal sem alterações na FC basal quando comparados com os animais que não foram estressados (naive). Os animais DREADD+ tratados com veículo ou CNO e submetidos ao CRS não apresentaram alterações nas atividades simpática e parassimpática cardíacas, e na FC intrínseca quando comparados com os animais naive. Além disso, os animais DREADD- tratados com veículo ou CNO e submetidos ao RS não apresentaram alterações na PAM e FC basais, atividades simpática e parassimpática cardíacas, e na FC intrínseca quando comparados com os animais naive. Nós mostramos também que os animais DREADD+ tratados com veículo e submetidos ao CRS apresentaram um aumento do tempo de permanência no centro da arena bem como um queda do tempo na periferia da arena no teste do campo aberto, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico nos animais cronicamente estressados. O tratamento com CNO nos animais DREADD+ que foram submetidos ao CRS reverteu esse efeito no testedo campo aberto, sugerindo que possivelmente a neurotransmissão glutamatérgica do HV medeia esse efeito do tipo ansiolítico nos animais cronicamente estressados. Os animais DREADD+ tratados com veículo ou CNO que foram submetidos ao CRS não apresentaram alterações no teste do labirinto em cruz elevado (LCE), no teste de esguicho de sacarose ou noteste do nado forçado (TNF) quando comparados com os animais naive. Os dados do presente estudo demonstraram que os animais DREADD- tratados com veículo e submetidos ao RS apresentaram uma redução no número de entradas nos braços abertos no teste do LCE quando comparados com os animais naive, sugerindo um efeito do tipo ansiogênico nos animais agudamente estressados. Os animais DREADD- tratados com veículo ou CNO submetidos ao RS não apresentaram alterações nos testes do campo aberto, do esguicho de sacarose e no TNF quando comparados com os animais naive.

8.1. Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica no HV nas respostas cardiovasculares basais, atividade autonômica cardíaca e FCi ao estresse crônico de restrição

Estudos prévios têm demonstrado a participação do hipocampo na modulação de respostas fisiológicas e comportamentais induzidas por estresse (HARTMANN *et al*., 2019; MORAES *et al*., 2014). Interessantemente, a inativação do hipocampo bloqueia as respostas cardiovasculares, mas não as respostas comportamentais induzidas pelo medo condicionado ao contexto, sugerindo que os componentes emocionais e autonômicos da reação ao estresse podem ser dissociados nessa região cerebral (RESSTEL *et al*., 2009; SCOPINHO *et al*., 2013) mostraram que a microinjeção bilateral do bloqueador sináptico inespecífico cloreto de cobalto (CoCl2, 1mM) no hipocampo dorsal (HD) ou ventral (HV) atenuou as respostas de PA e FC, bem como a diminuição da temperatura cutânea da cauda (medida indireta da redistribuição do fluxo sanguíneo mediado pelo sistema nervoso simpático) do animal induzida pelo RS, sugerindo que o HD e HV medeiam as respostas cardiovasculares e autonômica induzidas pelo RS. Adicionalmente, foi reportado que a microinjeção de L-glutamato no HV causa respostas cardiovasculares, caracterizadas por aumento de PA e FC. Nesse estudo, demonstraram que essas efeitos cardiovasculares foram abolidos pelo pré-tratamento local com: o antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) de glutamato, AP-7, sugerindo o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica no HV na modulação de respostas cardiovasculares (SANTINI *et al*., 2013).

Diante dos dados apresentados acima, avaliamos os parâmetros cardiovasculares basais, atividade autonômica cardíaca e FCi em animais cronicamente estressados bem como o papel da neurotransmissão glutamatérgica do HV nessas respostas.

Os resultados do presente estudo demonstraram que animais DREADD + tratados com

veículo e submetidos ao CRS obtiveram um aumento nos valores basais de PAM, semalterações nos valores basais de FC, atividades simpática e parassimpática cardíacas, e FCi quando comparados com os animais não estressados (naive), indicando um efeito pró- hipertensivo nos animais cronicamente estressados. Além disso, o tratamento com CNO não alterou a resposta de aumento basal da PAM causada pelo CRS, sugerindo que a neurotransmissão glutamatérgica do HV parece não estar envolvida na mediação dessa resposta.Resultados divergentes ao nosso foram encontrados na literatura, uma vez que demonstraram que a exposição ao estresse crônico repetido por 3, 5, 7 ou 10 dias consecutivos não causou alterações nos parâmetros cardiovasculares basais, no entanto causou um aumento da PAM e FC durante a sessão de estresse (BARRETO *et al.*, 2022 ; SANTOS *et al.*, 2020). Ferreira e colaboradores mostraram que o estresse de restrição por 1h/dia por 10 dias consecutivos não afetou os valores basais de PA e FC, no entanto aumentou o tônus simpático para o coração e diminuiu a atividade parassimpática cardíaca, além de prejudicar a função do barorreflexo (FERREIRA, 2016).

Uma explicação razoável para a discrepância de respostas observadas entre nossos resultados e os dados apresentados acima seria pelas diferenças na intensidade e frequência do modelo de estresse crônico repetido, uma vez que escolhemos o modelo utilizado por (BECHTOLD, 2009) que preconizou o estresse de restrição repetido por 2h por dia por 21 dias, onde foi observado uma habituação das respostas cardiovasculares frente ao estresse. Além disso, nossos resultados mimetizam estudos epidemiológicos em humanos que têm mostrado que indivíduos expostos a altas demandas psicológicas apresentam maior propensão a desenvolver hipertensão (PICKERING, 2004), podendo ser este considerado, para pesquisa translacional, um modelo experimental adequado de difunção cardiovascular induzida por estresse.

8.2. Envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica no HV nas respostas comportamentais ao estresse crônico de restrição

Ratos exibem uma preferência por locais fechados e por áreas próximas às superfícies verticais (tigmotatismo), evitando espaços abertos, quando exploram o ambiente (GROSSEN; KELLEY, 1972). Sugere-se que no teste do campo aberto, o comportamento do animal é gerado pelo conflito entre a motivação para explorar e a aversão a lugares abertos e iluminadose é utilizado para avaliar o efeito do tipo ansiogênico (WHIMBEY; AMP; DENENBERG, 1967; ASANO, 1986; CRUSIO *et al*., 1989). De acordo com isso, foi demonstrado que fármacos ansiolíticos e ansiogênicos tendem, respectivamente, aumentar ou diminuir a deambulação na arena (TREIT, 1985; SCHMITT; AMP; HIEMKE, 1998). Já o LCE é um testeamplamente utilizado também para avaliar o comportamento relacionado a ansiedade em roedores (CALHOON; TYE, 2015; CAMPOS *et al*., 2013; CRYAN; HOLMES, 2005). Dessa forma, nós avaliamos também as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade em animais cronicamente estressados bem como o papel da neurotransmissão glutamatérgica do HV nessas respostas. Embora não tenha sido observado alteração no comportamento exploratório no teste do LCE, animais DREADD+ tratados com veículo e submetidos aos CRS obtiveram um aumento do comportamento exploratório no teste do campo aberto, o que sugere um efeito do tipo ansiolítico nos animais cronicamente estressados.

As evidências acima refletem uma adaptação diferenciada induzida pelo CRS, onde os animais manifestaram maior segurança ao permanecer no local a que foram expostos (centro da arena), possivelmente ativando redes neurais inatas que coordenam as estratégias comportamentais e, dessa forma, permitindo aos animais interagirem com mudanças contínuas no ambiente (ZANGROSSI; FILE, 1992).

No entanto, dados da literatura têm demonstrado que animais submetidos a estresse

crônico repetido apresentam um efeito oposto ao observado no presente estudo, ou seja, um efeito do tipo ansiogênico (CHIBA *et al*., 2012). Novamente, uma possível explicação para a disparidade de respostas observadas seria pelas diferenças na intensidade, frequência e cronicidade do modelo de estresse crônico de restrição nos diferentes estudos. Interessantemente, o modelo utilizado no presente estudo, o CRS de 2h/dia por 21 dias, é um único na literatura que demonstra uma habituação das respostas cardiovasculares (BECHTOLD *et al*., 2009), sugerindo que há uma adaptação das respostas ao estresse crônico repetido.

Adicionalmente, os resultados no campo aberto demonstram que animais DREADD+ tratados com CNO e submetidos ao CRS apresentaram uma redução do comportamento exploratório quando comparados com os animais DREADD+ tratados com veículo e submetidos ao CRS, indicando que neurotransmissão glutamatérgica do HV participa da sinalização envolvida no comportamento do tipo ansiolítico induzido por estresse crônico em ratos. O sistema glutamatérgico do hipocampo sofre alterações plásticas frente a situações estressantes (BARTANUSZ *et al*., 1995), o que poderia explicar, em parte, os resultados obtidos no presente estudo. Além disso, estudos mostraram que o neuropeptídeo Y (NPY) podealterar sinapses hipocampais excitatórias, uma vez que, o NPY pode reduzir a transmissão sináptica fibras mossy (MF) - CA3, através da ativação de receptores NPY nos terminais MF que podem inibir a liberação de glutamato. Portanto, uma redução na neuromodulação mediadapelo NPY durante o CRS poderia induzir uma liberação maior de glutamato no HV, o que poderia explicar o efeito ansiolítico. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

O TNF é um modelo animal para estudo de comportamento do tipo depressivo por apresentar alto valor preditivo para fármacos antidepressivos (CRYAN *et al*., 2005; HEMBY *et al*., 1997; RÉNÉRIC *et al*., 2002 ; LÓPEZ, 2000; PAGE *et al*., 1999). O animal tentará primeiro escapar, mas eventualmente exibirá imobilidade (ou seja, flutuando com a ausência de

qualquer movimento, exceto aqueles necessários para manter o nariz acima da água (YANKELEVITCH *et al*., 2015). Além disso, esse modelo demonstrou ter um papel na tendência à depressão maior em animais expostos a situações estressantes (DORON *et al*., 2014; CASPI *et al*., 2003; KAUFMAN *et al*., 2006). O Teste de Esguicho de Sacarose foi realizado para avaliar também o comportamento do tipo depressivo dos ratos (MACHADO *et al*., 2012). O comportamento de autolimpeza (groomming) é um comportamento natural e instintivo de roedores e é medido em termos de lamber, morder e arranhar a pelagem (MACHADO *et al*., 2012). Este comortamento está relacionado também com a termorregulação, interação social e diminuição do estresse, portanto pode ser utilizado como parâmetro para avaliar estresse e anedonia (SMOLINSKY *et al*., 2009).

Além disso, estudo prévio reportou que CRS diminui a expressão de receptor glutamatérgico metabotrópico mGluR5 em astrócitos no hipocampo de camundongos que exibiram comportamentos do tipo depressivo, fornecendo evidências do papel do sistema glutamatérgico na produção dos fenótipos comportamentais da depressão (LIU, 2022). Dados da literatura demonstram ainda que o tratamento sistêmico com antagonistas de receptores glutamatérgicos do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) promove efeitos antidepressivos nos testes do nado forçado e desamparo aprendido (TRULLAS; SKOLNICK, 1990; JOCA *et al*., 2003), sugerindo que o sistema glutamatérgico teria um papel facilitatório na mediação do efeito do tipo depressivo.

Adicionalmente, foi observado que a microinjeção intra-hipocampal de antagonistas de receptores NMDA impede o aparecimento das consequências comportamentais induzidas pela exposição a diferentes estressores incontroláveis (nado forçado, imobilização, choques elétricos nas patas (JOCA *et al*., 2003). Dessa forma, nós avaliamos também as respostas comportamentais relacionadas à depressão em animais cronicamente estressados bem como o papel da neurotransmissão glutamatérgica do HV nessas respostas.

Os resultados no TNF e do Esguicho de Sacarose demonstraram que os animais DREADD+ tratados com veículo ou CNO e submetidos ao CRS não apresentaram alterações no tempo de imobilidade e no comportamento de autolimpeza quando comparados aos animais naive (sem estresse), sugerindo que o estresse crônico de restrição não apresentou efeito relacionado à depressão e que a neurotransmissão glutamatérgica do HV parece não participar da sinalização envolvida em resposta comportamental relacionada à depressão. Dados da literatura têm demonstrado que animais submetidos a estresse crônico repetido apresentam um efeito oposto ao observado no presente estudo, ou seja, um efeito do tipo depressivo (CHIBA *et al*., 2012).

Adicionalmente, estudo prévio da literatura demonstrou que animais submetidos a 6h/dia por 28 dias de estresse crônico repetido apresentaram um maior tempo imobilidade no teste do nado forçado (realizado 96h após a última sessão de restrição), sendo um comportamento preditivo de depressão (CHIBA *et al*., 2012). Nesse trabalho de Chiba e colaboradores (2012), as consequências emocionais do estresse crônico parecem ser decorrentes de uma adaptação anormal do estresse.

Por outro lado, no estudo de Bechtold e colaboradores, onde os animais submetidos ao estresse crônico de restrição (5 a 7 dias por semana, durante 1-2 h por sessão de restrição por 21 a 25 dias) apresentaram uma proeminente redução da pressão arterial e da frequência cardíaca quando comparados com os animais submetidos ao estresse (BECHTOLD *et al*., 2009), sendo considerado uma adaptação positiva do estresse; o que poderia justificar, em parte, a adaptação comportamental observada no presente estudo. Portanto, reforçando mais uma vez, a discrepância observada entre as respostas reportadas na literatura com as do presente projeto poderia ser decorrente das alterações na intensidade, frequência e cronicidade do modelo de estresse crônico de restrição que poderiam promover respostas anômalas.

8.3. Efeito inespecífico do CNO nas respostas cardiovasculares basais, atividade autonômica cardíaca e FCi bem como nas respostas comportamentais ao estresse agudo de restrição

No presente estudo, foram utilizados DREADD+ que é DREADD hM4D Gi- acoplado, fundido com mCherry sob o controle do promotor CaMKIIa para silenciamento neuronal induzido por CNO e DREADD- que é a proteína verde fluorescente sob controle do promotor CaMKIIa. O DREADD- não contém em sua composição o hM4Di, sendo utilizado como controle experimental de um possível efeito inespecífico do CNO, uma vez que foi demonstrado que uma pequena proporção de CNO administrado pode ser metabolizado em clozapina, uma droga antipsicótica com atividade em vários receptores endógenos (ASHBY; WANG,1996; SELENT *et al*., 2008; JANN *et al*., 1994; MACLAREN *et al*.,2016). Se presente em altas concentrações, o suficiente para afetar os receptores endógenos, a clozapina pode causar efeitos além daqueles mediados por CNO atuando nos DREADDs (MAHLER *et al*., 2014).

De acordo com Gomez, et al a clozapina metabolizada pode contribuir para a ativação do DREADD após a injeção periférica de CNO (GOMEZ *et al*., 2017) e, mesmo que a concentração de CNO/clozapina seja baixa o suficiente para não causar efeitos observáveis em animais que não expressam DREADD, suas ações nos receptores endógenos podem interagir com os efeitos do DREADD de maneiras ainda desconhecidas (MAHLER *et al*., 2014). No entanto, várias pesquisas falharam em encontrar efeitos comportamentais independentes da ativação de DREADD pela microinjeção de CNO na área tegmental ventral (MAHLER *et al*., 2014), septo lateral (MCGLINCHEY; ASTON, 2017), hipocampo dorsal (GE *et al.*, 2017) , ou córtex orbital (LICHTENBERG *et al.*, 2017). Embora existam possíveis ressalvas a serem consideradas com o uso de CNO, a tecnologia DREADD é considerada um grande avanço na neurociência, independentemente do agonista empregado.

Portanto, para um melhor controle experimental, além dos animais DREADD+ tratados com veículo e submetidos ao CRS, nós realizamos também os experimentos nos animais DREADD- tratados com veículo ou CNO. Como o intuito era avaliar o efeito inespecífico do CNO (ou o efeito mediado pela conversão do CNO em clozapina), nós definimos o estresse agudo de restrição como modelo para favorecer o procedimento experimental. Dessa forma, nós avaliamos os parâmetros cardiovasculares basais, atividade autonômica cardíaca, FCi e respostas comportamentais em animais agudamente estressados bem como o efeito inespecífico do CNO nessas respostas. Os resultados demonstraram que os animais DREADD- tratados com veículo ou CNO e submetidos ao RS não apresentaram alterações na PAM e FC basais, atividades simpática e parassimpática cardíacas, e na FC intrínseca quando comparados com os animais não estressados (naive), sugerindo que o estresse agudo não causa alterações nos parâmetros cardiovasculares basais, corroborando com os dados encontrados na literatura (SANTOS, 2020).

Embora não tenha se observado alterações no comportamento exploratório no teste do campo aberto, os resultados do presente estudo mostraram que os animais DREADD- tratados com veículo e submetidos ao RS apresentaram uma redução na exploração dos braços abertos no teste do LCE quando comparados com os animais naive, sugerindo um efeito do tipo ansiogênico nos animais agudamente estressados. Nossos resultados corroboraram com os dados da literatura na qual já está bem estabelecido que o estresse agudo de restrição causa um efeito do tipo ansiogênico em ratos (BUSNARDO *et al*., 2019; GOUVEIA *et al*., 2016; BUSNARDO *et al*., 2013; PADOVAN; GUIMARÃES, 2004). Nosso estudo também mostrou que os animais DREADD- tratados com veículo ou CNO submetidos ao RS não apresentaram alterações no teste do esguicho de sacarose e no TNF quando comparados com os animais naive, sugerindo que o estresse agudo não promove efeito do tipo depressivo e que a neurotransmissão glutamatérgica do HV parece não estar envolvida em comportamentos relacionados à depressão

induzida por estresse. Pesquisas prévias têm apresentado resultados contraditórios em relação ao impacto do estresse agudo nos comportamentos observados no TNF (MARCHI, 2021). Na literatura, têm sido observados relatos de aumento, diminuição ou ausência de efeito no tempo de imobilidade no TNF após estresse agudo, que pode ser decorrente das diferenças nos protocolos experimentais tais como as condições de alojamento dos animais, a intensidade e a frequência do estresse, a cronicidade da exposição, os modelos do estímulo estressante (se são escapáveis ou inescapáveis) e também à idade dos animais envolvidos no estudo. (MARCHI, 2021; ARMARIO, 1991; BERNAL, 2009; SEVGI, 2006; PRINCE, 1984; PLATT,1982; WEISS, 1981; BETTIO, 2014; MORETTI, 2013).

Diante de algumas limitações identificadas no presente estudo, sugere-se que pesquisas futuras concentrem-se na comparação de diferentes modelos experimentais de respostas comportamentais induzidas pelo estresse, bem como na implementação de um controle mais rigoroso das variáveis independentes que possam impactar os resultados das análises.

9. CONCLUSÃO

Os dados da pesquisa apresentados fornecem novas evidências sobre o papel da neurotransmissão glutamatérgica do HV nas consequências emocionais induzidas pelo estresse crônico repetido. Dessa forma, os dados demonstraram que a neurotransmissão glutamatérgica do HV tem um papel facilitatório do efeito ansiolítico induzido pelo estresse crônico em ratos DREADD+. Além disso, os dados do estudo sugerem que o efeito do CNO foi mediado por ativação dos receptores DREADD hM4Di e não por um efeito inespecífico. Os resultados mostraram também que o estresse crônico repetido em ratos DREADD+ causou um efeito pró-hipertensivo, reforçando o papel do estresse como fator de risco para doenças cardiovasculares.

10. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, G. M.; ROGAN, S. C.; ABBAS, A. I.; ARMBRUSTER, B. N.; PEI, Y.;

ALLEN, J. A.; NONNEMAN, R. J.; HARTMANN, J.; MOY, S. S.; NICOLELIS, M. A.;

MCNAMARA, J. O.; ROTH, B. L. Remote Control of Neuronal Activity in Transgenic Mice Expressing Evolved G Protein-Coupled Receptors. *Neuron*, v. 63, n. 1, p. 27–39, 2009. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.014.

AMIN, S. N.; EL-AIDI, A. A.; ALI, M. M.; ATTIA, Y. M.; RASHED, L. A. Modification of

Hippocampal Markers of Synaptic Plasticity by Memantine in Animal Models of Acute and Repeated Restraint Stress: Implications for Memory and Behavior. NeuroMolecular Medicine, v. 17, n. 2, p. 121–136, 2015. https://doi.org/10.1007/s12017-015-8343-0.

AMINI-KHOEI, H.; MOHAMMADI-ASL, A.; AMIRI, S.; HOSSEINI, M.-J.; MOMENY, M.; HASSANIPOUR, M.; RASTEGAR, M.; HAJ-MIRZAIAN, A.; MIRZAIAN, A. H.-;

SANJARIMOGHADDAM, H.; MEHR, S. E.; DEHPOUR, A. R. Oxytocin mitigated the depressive-like behaviors of maternal separation stress through modulating mitochondrial function and neuroinflammation. *Progress in Neuro- Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 76, p. 169–178, 2017. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.02.022.

ARMBRUSTER, B. N.; LI, X.; PAUSCH, M. H.; HERLITZE, S.; ROTH, B. L. Evolving the

lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 12, p. 5163–5168. 2007. https://doi.org/10.1073/pnas.0700293104.

ARMARIO, A.; GIL, M., MARTI, J.; POL, O.; BALASCH, J. Influence of various acute stressors on the activity of adult male rats in a holeboard and in the forced swim test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 39, n. 2, p. 373-377, 1991. https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90194-7.

BAIN, M. J.; DWYER, S. M.; RUSAK, B. Restraint stress affects hippocampal cell proliferation differently in rats and mice. Neuroscience Letters, v. 368, n. 1, 7–10, 2004. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.04.096.

BARRETTO-DE-SOUZA, L.; BENINI, R.; REIS-SILVA, L. L.; CRESTANI, C. C. Role of

CRF1 and CRF2 receptors in the lateral hypothalamus in cardiovascular and anxiogenic responses evoked by restraint stress in rats: Evaluation of acute and chronic exposure. *Neuropharmacology*, v. 212, n. 109061, 2022.

https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109061.

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. https://doi.org/10.1016/0165-1838(89)90090-8.

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. https://doi.org/10.1016/0165-1838(89)90090-8.

BECHTOLD, A. G.; PATEL, G.; HOCHHAUS, G.; SCHEUER, D. A. Chronic blockade of

hindbrain glucocorticoid receptors reduces blood pressure responses to novel stress and attenuates adaptation to repeated stress. American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 296, n. 5, p.1445–R1454, 2009. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00095.2008.

BECHTOLD, A. G.; PATEL, G.; HOCHHAUS, G.; SCHEUER, D. A. Chronic blockade of

hindbrain glucocorticoid receptors reduces blood pressure responses to novel stress and attenuates adaptation to repeated stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 296, n. 5, p. 1445–R1454, 2009. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00095.2008.

BERNAL-MORALES, B.; CONTRERAS, C. M.; CUETO-ESCOBEDO, J. Acute restraint

stress produces behavioral despair in weanling rats in the forced swim test. *Behavioural Processes*, v. 82, p. 219–222, 2009. https://doi.org/10.1016/j.beproc.2009.06.006.

BERMAN, R. M.; CAPPIELLO, A.; ANAND, A.; OREN, D. A.; HENINGER, G. R.;

CHARNEY, D. S.; KRYSTAL, J. H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. Biological Psychiatry, v. 47, n. 4, p. 351–354, 2000. https://doi.org/10.1016/S0006-

3223(99)00230-9.

BETTIO, L. E. B.; FREITAS, A. E.; NEIS, V. B.; SANTOS, D. B.; RIBEIRO, C. M.; ROSA,

P. B.; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. S. Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 127, p.7–14, 2014. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.10.002.

BONANNO, G.; GIAMBELLI, R.; RAITERI, L.; TIRABOSCHI, E.; ZAPPETTINI, S.;

MUSAZZI, L.; RAITERI, M.; RACAGNI, G.; POPOLI, M. Chronic Antidepressants Reduce Depolarization-Evoked Glutamate Release and Protein Interactions Favoring Formation of SNARE Complex in Hippocampus. The Journal of Neuroscience, v. 25, n. 13, p. 3270–3279, 2005. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5033-04.2005.

BORSINI, F.; LECCI, A.; VOLTERRA, G.; MELI, A. A model to measure anticipatory anxiety in mice? Psychopharmacology, v. 98 n. 2, p. 207–211, 1989.

https://doi.org/10.1007/BF00444693.

BOUGUIYOUD, N.; ROULLET, F.; BRONCHTI, G.; FRASNELLI, J.; AL AÏN, S. Anxiety

and Depression Assessments in a Mouse Model of Congenital Blindness. *Frontiers in Neuroscience*, v. 15, 2022. https://doi.org/10.3389/fnins.2021.807434.

BOURANE, S.; DUAN, B.; KOCH, S. C.; DALET, A.; BRITZ, O.; GARCIA-CAMPMANY,

L.; KIM, E.; CHENG, L.; GHOSH, A.; MA, Q.; GOULDING, M. Gate control of mechanical itch by a subpopulation of spinal cord interneurons. Science, v.350 n.6260, p.550–554, 2015. https://doi.org/10.1126/science.aac8653.

BOYER, P.-A.; SKOLNICK, P.; FOSSOM, L. H. Chronic administration of imipramine and citalopram alters the expression of NMDA receptor subunit mRNAs in mouse brain. Journal of Molecular Neuroscience, v. 10 n.3, p. 219–233,1998. https://doi.org/10.1007/BF02761776
BUSNARDO, C.; CRESTANI, C. C.; FASSINI, A.; RESSTEL, L. B. M.; CORRÊA, F. M. A.

NMDA and non-NMDA glutamate receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulate different stages of hemorrhage-evoked cardiovascular responses in rats. *Neuroscience*, v. 320, p. 149–159, 2016.

https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.02.003.

BUSNARDO, C.; CRESTANI, C. C.; SCOPINHO, A. A.; PACKARD, B. A.; RESSTEL, L.

B. M.; CORREA, F. M. A.; HERMAN, J. P. Nitrergic 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, 2019. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.11.001.

BUSNARDO, C.; CRESTANI, C. C.; TAVARES, R. F.; RESSTEL, L. B. M.; CORREA, F.

M. A. Cardiovascular responses to l-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus are mediated by a local nitric oxide-guanylate cyclase mechanism. *Brain Research*, v. 1344, p. 87–95, 2010. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.023.
BUSNARDO, C.; ALVES, F. H. F.; CRESTANI, C. C.; SCOPINHO, A. A.; RESSTEL, L. B. M.; CORREA, F. M. A. Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *European Neuropsychopharmacology*, v. 23, n. 11, p. 1611– 1622, 2013. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.11.002.

BUSNARDO, C.; CRESTANI, C. C.; SCOPINHO, A. A.; PACKARD, B. A.; RESSTEL, L. B.

M.; CORREA, F. M. A.; HERMAN, J. P. Nitrergic 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, 2019. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.11.001.

CAMERON, H. A.; GOULD, E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience*, v. 61, n. 2, p. 203–209, 2014. https://doi.org/10.1016/0306-

4522(94)90224-0.

CAMPOS, C. A.; RITTER, R. C. NMDA-type glutamate receptors participate in reduction of food intake following hindbrain melanocortin receptor activation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v.308, n.1, p1–9, 2015. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00388.2014.

CHIBA, S.; NUMAKAWA, T.; NINOMIYA, M.; RICHARDS, M. C.; WAKABAYASHI, C.;

KUNUGI, H. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 39 n.1, p.112–119, 2012. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.05.018.

COSTA-FERREIRA, W.; VIEIRA, J. O.; ALMEIDA, J.; GOMES-DE-SOUZA, L.;

CRESTANI, C. C. Involvement of Type 1 Angiontensin II Receptor (AT1) in Cardiovascular Changes Induced by Chronic Emotional Stress: Comparison between Homotypic and Heterotypic Stressors. *Frontiers in Pharmacology*, v. 7, 2016.

https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00262.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.13 n.2, p.167–170, 1980. https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90067-2.

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

https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00251.

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

A. N-Methyl-d-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. *Neuroscience Research*, v.67 *n.*4, p.317–326, 2010. https://doi.org/10.1016/j.neures.2010.05.001.

CRESTANI, C. C.; TAVARES, R. F.; ALVES, F. H. F.; RESSTEL, L. B. M.; CORREA, F.

M. A. 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.

https://doi.org/10.3109/10253890902927950.

CURADO, T. A. F. *O efeito da modulacao quimiogenetica de neuronios motores do hipoglosso*

sobre a atividade do musculo genioglosso. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Da Universidade de Sao Paulo, São Paulo, 2017.

DAL-ZOTTO, S.; MARTÍ, O.; ARMARIO, A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behavioural Brain Research*, v. 114, n. 1–2, p. 175–181, 2000. https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00220-5.

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. 429–443, 2015. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00051.2015.

DANESE, A.; MCEWEN, B. S. Adverse childhood experiences, allostasis, allostatic load, and age-related disease. *Physiology & Behavior*, v. 106, n.1, p. 29–39, 2012. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.08.019.

DETKE, M. J.; JOHNSON, J.; LUCKI, I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, v. 5, n.2, p. 107–112, 1997.

https://doi.org/10.1037/1064-1297.5.2.107.

ELLISDON, A. M.; HALLS, M. L. Compartmentalization of GPCR signalling controls unique cellular responses. *Biochemical Society Transactions*, v. 44, n. 2, p. 562–567, 2016. https://doi.org/10.1042/BST20150236.

FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, v. 65, n.1, p.7–19, 2010.

https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031.

FARES, J.; BOU DIAB, Z.; NABHA, S.; FARES, Y. (2019). Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles. *International Journal of Neuroscience*, v. 129, n. 6, p.598–611, 2019. https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1545771.

FERGUSON, S. M.; ESKENAZI, D.; ISHIKAWA, M.; WANAT, M. J.; PHILLIPS, P. E. M.;

DONG, Y.; ROTH, B. L.; NEUMAIER, J. F. Transient neuronal inhibition reveals opposing roles of indirect and direct pathways in sensitization. *Nature Neuroscience*, v.14, n.1, p.22–24, 2011. https://doi.org/10.1038/nn.2703.

GIAP, B. T.; JONG, C. N.; RICKER, J. H.; CULLEN, N. K.; ZAFONTE, R. D. The

Hippocampus: Anatomy, Pathophysiology, and Regenerative Capacity. *Journal of Head Trauma Rehabilitation*, v. 15, n. 3, p 875–894, 2000. https://doi.org/10.1097/00001199-

200006000-00003.

GIROTTI, M.; PACE, T. W. W.; GAYLORD, R. I.; RUBIN, B. A.; HERMAN, J. P.;

SPENCER, R. L. Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience* v. 138, n. 4, p. 1067–1081, 2006. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.12.002.

GOMES-DE-SOUZA, L.; COSTA-FERREIRA, W.; OLIVEIRA, L. A.; BENINI, R.;

CRESTANI, C. C. Cannabinoid receptor type 1 in the bed nucleus of the stria terminalis modulates cardiovascular responses to stress via local N-methyl-D-aspartate receptor/neuronal nitric oxide synthase/soluble guanylate cyclase/protein kinase G signaling. *Journal of Psychopharmacology*, v. 34, n. 4, p. 429–440, 2020.

https://doi.org/10.1177/0269881119897556.

GOMEZ, J. L.; BONAVENTURA, J.; LESNIAK, W.; MATHEWS, W. B.; SYSA-SHAH, ‘'P.;

RODRIGUEZ, L. A.; ELLIS, R. J.; RICHIE, C. T.; HARVEY, B. K.; DANNALS, R. F.;

POMPER, M. G.; BONCI, A.; MICHAELIDES, M.. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science*, v. 357, n. 6350, p. 503–507, 2017. https://doi.org/10.1126/science.aan2475.

GOOSSENS, M.-G.; LARSEN, L. E.; VERGAELEN, M.; WADMAN, W.; VAN DEN HAUTE, C.; BRACKX, W.; PROESMANS, S.; DESLOOVERE, J.; CHRISTIAEN, E.; CRAEY, E.; VANHOVE, C.; VONCK, K.; BOON, P.; RAEDT, R. Level of hM4D(Gi)

DREADD Expression Determines Inhibitory and Neurotoxic Effects in the Hippocampus. Eneuro, v.8 n.6, 2021. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0105-21.2021.

GOULD, E. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends in Cognitive Sciences*, v.3 n.5, p.186–192, 1999. https://doi.org/10.1016/S1364-6613(99)01310-8.

GOUVEIA, M. K.; MIGUEL, T. T.; BUSNARDO, C.; SCOPINHO, A. A.; CORRÊA, F. M.

A.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CRESTANI, C. C. Dissociation in control of physiological and behavioral responses to emotional stress by cholinergic neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. *Neuropharmacology*, v.101, p.379–388, 2016.

https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.018.

GUETTIER, J.-M.; GAUTAM, D.; SCARSELLI, M.; DE AZUA, I. R.; LI, J. H.;

ROSEMOND, E.; MA, X.; GONZALEZ, F. J.; ARMBRUSTER, B. N.; LU, H.; ROTH, B. L.;

WESS, J. A chemical-genetic approach to study G protein regulation of β cell function in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.106, n.45, p19197–19202, 2009. https://doi.org/10.1073/pnas.0906593106.

HAGENA, H.; HANSEN, N.; MANAHAN-VAUGHAN, D. β-Adrenergic Control of

Hippocampal Function: Subserving the Choreography of Synaptic Information Storage and Memory. *Cerebral Cortex*, v. 26, n. 4, p. 1349–1364, 2016. https://doi.org/10.1093/cercor/bhv330'.

HARTMANN, A.; FASSINI, A.; SCOPINHO, A.; CORREA, F. M.; GUIMARÃES, F. S.;

LISBOA, S. F.; RESSTEL, L. B. Role of the endocannabinoid system in the dorsal hippocampus in the cardiovascular changes and delayed anxiety-like effect induced by acute restraint stress in rats. *Journal of Psychopharmacology*, v. 33, n.5, p. 606–614, 2019. https://doi.org/10.1177/0269881119827799.

HE, X.; LI, J.; ZHOU, G.; YANG, J.; MCKENZIE, S.; LI, Y.; LI, W.; YU, J.; WANG, Y.; QU,

J.; WU, Z.; HU, H.; DUAN, S.; MA, H. Gating of hippocampal rhythms and memory by synaptic plasticity in inhibitory interneurons. Neuron, v.109, n.6, p.1013-1028, 2021. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.01.014.

HERMAN, J. P. Neural control of chronic stress adaptation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v.7, 2013. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00061.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Trends in Neurosciences*, v.*20* n.2, p.78–84, 1997. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)10069-2.

HUANG, P.; LI, C.; FU, T.; ZHAO, D.; YI, Z.; LU, Q.; GUO, L.; XU, X. Flupirtine attenuates

chronic restraint stress-induced cognitive deficits and hippocampal apoptosis in male mice. *Behavioural Brain Research*, v. 288, p. 1–10, 2015. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.004.
JOCA, S. R. L.; FERREIRA, F. R.; GUIMARÃES, F. S. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrergic neurotransmitter systems. *Stress*, v. 10, n. 3, p. 227–249, 2007. https://doi.org/10.1080/10253890701223130.

JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Estresse, depressão e hipocampo. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.25, n. 2, p. 46–51, 2003. https://doi.org/10.1590/S1516-44462003000600011.

KITAMURA, Y.; ARAKI, H.; NAGATANI, T.; TAKAO, K.; SHIBATA, K.; GOMITA, Y.

Influence of imipramine on the duration of immobility in chronic forced-swim- stressed rats.

Acta Medica Okayama, v. 58, n. 6, p. 271–274, 2004. https://doi.org/10.18926/AMO/32092.
LEUNER, B.; GLASPER, E. R.; GOULD, E. Sexual Experience Promotes Adult Neurogenesis in the Hippocampus Despite an Initial Elevation in Stress Hormones. *PLoS ONE*, v.5, n.7, p.11597, 2010. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011597.

LIU, C.; YANG, T.-Q.; ZHOU, Y.-D.; SHEN, Y. Reduced astrocytic mGluR5 in the hippocampus is associated with stress-induced depressive-like behaviors in mice. *Neuroscience*

Letters, v.784, p.136766, 2022. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136766.

LÓPEZ, A. J.; KRAMÁR, E.; MATHEOS, D. P.; WHITE, A. O.; KWAPIS, J.; VOGEL-

CIERNIA, A.; SAKATA, K.; ESPINOZA, M.; WOOD, M. A. Promoter-Specific Effects of DREADD Modulation on Hippocampal Synaptic Plasticity and Memory Formation. *The Journal of Neuroscience*, v. 36 n. 12, p. 3588–3599, 2016. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3682-15.2016.

LÓPEZ, J. F.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Neural circuits mediating stress. *Biological Psychiatry*, v. 46, n. 11, p. 1461–1471, 1999. https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00266-8.
MACHADO, D. G.; CUNHA, M. P.; NEIS, V. B.; BALEN, G. O.; COLLA, A.; GRANDO, J.; BROCARDO,P. S.; BETTIO, L. E. B.; CAPRA, J. C.; RODRIGUES, A. L. S. Fluoxetine

reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 103, n. 2, p. 220–229, 2012. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.08.024.

MAGARIÑOS, A. M.; VERDUGO, J. M. G.; MCEWEN, B. S. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.94, n.25, p.14002–14008, 1997. https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.14002.

MARCHI-COELHO, C.; COSTA-FERREIRA, W.; REIS-SILVA, L. L.; CRESTANI, C. C.

Angiotensinergic Neurotransmissions in the Medial Amygdala Nucleus Modulate Behavioral Changes in the Forced Swimming Test Evoked by Acute Restraint Stress in Rats. Cells, v.10 n.5, p.1217, 2021. https://doi.org/10.3390/cells10051217.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. Published on the World Wide Web on 22 November 2000. *Brain Research*, v. 886, n. 1–2, p. 172–189, 2000. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02950-4.

MCEWEN, B. S. Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress. *Chronic Stress*, v. 1, n. 247054701769232, 2017. https://doi.org/10.1177/2470547017692328.

MOBERG, G. P. Biological Response to Stress: Key to Assessment of Animal Well- Being? In *Animal Stress* p. 27–49, 1985. Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7544-6_3.

MOGRABI, K. D. M.; SUCHECKI, D.; DA SILVA, S. G.; COVOLAN, L.; HAMANI, C.

Chronic unpredictable restraint stress increases hippocampal pro-inflammatory cytokines and decreases motivated behavior in rats. *Stress*, v. 23, n. 4, p. 427–436, 2020. https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1712355.

MORAES-NETO, T. B.; SCOPINHO, A. A.; BIOJONE, C.; CORRÊA, F. M. A.; RESSTEL,

L. B. M. Involvement of dorsal hippocampus glutamatergic and nitrergic neurotransmission in

autonomic responses evoked by acute restraint stress in rats. *Neuroscience*, v.258, p.364–373, 2014. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.022.

MORETTI, M.; BUDNI, J.; DOS SANTOS, D. B.; ANTUNES, A.; DAUFENBACH, J. F.;

MANOSSO, L. M.; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. S. Protective Effects of Ascorbic Acid on Behavior and Oxidative Status of Restraint-Stressed Mice. Journal of Molecular Neuroscience, v.49, n.1, p.68–79, 2013. https://doi.org/10.1007/s12031-012-9892-4.

NAKAJIMA, K.; WESS, J. Design and Functional Characterization of a Novel, Arrestin-Biased Designer G Protein-Coupled Receptor. *Molecular Pharmacology*, v. 82, n.4, p.575–582, 2012. https://doi.org/10.1124/mol.112.080358.

NEWSON, M. J. F.; POPE, G. R.; ROBERTS, E. M.; LOLAIT, S. J.; O'CARROLL, A.-M.

Stress-dependent and gender-specific neuroregulatory roles of the apelin receptor in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis response to acute stress. *Journal of Endocrinology*, v. 216, n.1, p.99–109, 2013. https://doi.org/10.1530/JOE-12-0375.

PADOVAN, C. M.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. (2000). Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 67, n.2, p.325–330, 2000. https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00361-0.

PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Antidepressant-like effects of NMDA- receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.77, n.1, p.15–19, 2004. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2003.09.015.

PATI, S.; SALVI, S. S.; KALLIANPUR, M.; VAIDYA, B.; BANERJEE, A.; MAITI, S.;

CLEMENT, J. P.; VAIDYA, V. A. Chemogenetic Activation of Excitatory Neurons Alters Hippocampal Neurotransmission in a Dose-Dependent Manner. Eneuro, v.6, n.6, p.124, 2019. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0124-19.2019.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v . 14, n.3, p . 149–167, 1985. https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7.

PENTKOWSKI, N. S.; BLANCHARD, D. C.; LEVER, C.; LITVIN, Y.; BLANCHARD, R. J.

Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *European Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 8, p. 2185–2196, 2006. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04754.x.

PETRIE, R. X. A.; REID, I. C.; STEWART, C. A. The N-methyl-d-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 87, n.1, p. 11–25, 2000.

https://doi.org/10.1016/S0163-7258(00)00063-2.

PLATT, J. E.; STONE, E. A. Chronic restraint stress elicits a positive antidepressant response on the forced swim test. European Journal of Pharmacology, v.82, n.3–4, p.179–181, 1982. https://doi.org/10.1016/0014-2999(82)90508-8.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, v. 266, n. 5604, p. 730–732, 1997. https://doi.org/10.1038/266730a0.

PRINCE, C. R.; ANISMAN, H. Acute and chronic stress effects on performance in a forced-swim task. Behavioral and Neural Biology, v.42, n.2, p.99–119, 1984. https://doi.org/10.1016/S0163-1047(84)90942-7.

REIS, D. G.; FORTALEZA, E. A. T.; TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A. Role of the

autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. Stress v. 17, n. 4, p. 362-372, 2014. doi: 10.3109/10253890.2014.930429.

RESSTEL, L. B. M.; TAVARES, R. F.; LISBOA, S. F. S.; JOCA, S. R. L.; CORRÊA, F. M.

A.; GUIMARÃES, F. S. 5-HT 1A receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuationof behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *British Journal of Pharmacology*, v. 156, n. 1, p. 181–188, 2009. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00046.x.

RIVERA, E. A. B. Ética na Experimentação animal. *In*: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S., orgs. *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002.

ROTH, B. L. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron*, v. 89, n. 4, p.683–694, 2016. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.040.

SANTINI, C. O.; FASSINI, A.; SCOPINHO, A. A.; BUSNARDO, C., CORRÊA, F. M. A.;

RESSTEL, L. B. M. The ventral hippocampus NMDA receptor/nitric oxide/guanylate cyclase pathway modulates cardiovascular responses in rats. Autonomic Neuroscience, v.177, n.2, p.244–252, 2013. https://doi.org/10.1016/j.autneu.2013.05.008.

SANTOS, C. E.; BENINI, R.; CRESTANI, C. C. Spontaneous recovery, time course, and circadian influence on habituation of the cardiovascular responses to repeated restraint stress in rats. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, v.472, n.10, p.1495–1506, 2020. https://doi.org/10.1007/s00424-020-02451-9.

SARTIM, A. G.; GUIMARÃES, F. S.; JOCA, S. R. L. Antidepressant-like effect of cannabidiol injection into the ventral medial prefrontal cortex—Possible involvement of 5-HT1A and CB1

receptors. *Behavioural Brain Research*. v. 303, p. 218-227, 2016. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.01.033.

SCOPINHO, A. A.; LISBOA, S. F. S.; GUIMARÃES, F. S.; CORRÊA, F. M. A.; RESSTEL,

L. B. M.; JOCA, S. R. L. Dorsal and Ventral Hippocampus Modulate Autonomic Responses but Not Behavioral Consequences Associated to Acute Restraint Stress in Rats. *PLoS ONE*, v.8, n.10, p.77750, 2013. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077750.

SELYE, H. The General Adaptation Syndrome and the Diseases of Adaptation1. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v.6, n.2, p.117–230, 1946. https://doi.org/10.1210/jcem-6-2-117.

SEVGI, S.; OZEK, M.; EROGLU, L. L-NAME prevents anxiety-like and depression-like behaviour inrats exposed to restraint stress. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, v.28, n.2, p.95, 2006. https://doi.org/10.1358/mf.2006.28.2.977840.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; ANTONIO, V. E. Neurociência da mente e do comportamento. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v.66, n.3, p.779–779, 2008. https://doi.org/10.1590/S0004-282X2008000500042.

SMITH, K. S.; BUCCI, D. J.; LUIKART, B. W.; MAHLER, S. V. DREADDS: Use and

application in behavioral neuroscience. Behavioral Neuroscience, v.130, n.2, p.137–155, 2016. https://doi.org/10.1037/bne0000135.

SMOLINSKY, A. N.; BERGNER, C. L.; LAPORTE, J. L.; KALUEFF, A. V. *Analysis of*

Grooming Behavior and Its Utility in Studying Animal Stress, Anxiety, and Depression p.21–36, 2009. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_2.

SOFIA, R. D.; HARAKAL, J. J. Evaluation of ketamine HCl for anti-depressant activity.

Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie, v.214, n.1, p.68– 74, 1975.
SOKOLOWSKI, K.; CORBIN, J. G. Wired for behaviors: from development to function of innate limbic system circuitry. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 5, 2012. https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00055.

SPIACCI, A.; POBBE, R. L. H.; MATTHIESEN, M.; ZANGROSSI, H. (2016). 5-HT1A

receptors of the rat dorsal raphe lateral wings and dorsomedial subnuclei differentially control anxiety- and panic-related defensive responses. *Neuropharmacology*, v.107, p.471–479, 2016. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.06.015.

STERLING, P. Allostasis: A model of predictive regulation. *Physiology and Behavior*, v.106, n.1, p.5–15, 2012. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.06.004.

STRANGE, B. A.; WITTER, M. P.; LEIN, E. S.; MOSER, E. I. Functional organization of the

hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, v.15, n.10, p.655– 669, 2014. https://doi.org/10.1038/nrn3785.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *European Journal of Pharmacology*, v.185, n.1, p.1–10, 1990. https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)90204-J

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, v.10, n.6, p.397–409, 2009. https://doi.org/10.1038/nrn2647.

URBAN, D. J.; ROTH, B. L. DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs): Chemogenetic Tools with Therapeutic Utility. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.55, n.1, p.399–417, 2015. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124803.

VENKATESH, B.; RAM, N. "Eustress : A Unique Dimension To Stress Management," Working papers 2015-09-10. *Voice of Research*. v.4, n. 2, 2015. https://ideas.repec.org/p/vor/issues/2015-09-10.html.

VERES, J. M.; ANDRASI, T.; NAGY-PAL, P.; HAJOS, N. CaMKIIα Promoter-Controlled

Circuit Manipulations Target Both Pyramidal Cells and Inhibitory Interneurons in Cortical Networks. Eneuro, v.10, n.4, p.0070-2, 2023. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0070-23.2023.

VON WERNE BAES, C.; DE CARVALHO TOFOLI, S. M.; MARTINS, C. M. S.; JURUENA,

M. F. Assessment of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity: glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor function in depression with early life stress – a systematic review. *Acta Neuropsychiatrica*, v. 24, n.1, p. 4–15, 2012. https://doi.org/10.1111/j.1601-5215.2011.00610.x.

WEISS, J. M.; GOODMAN, P. A.; LOSITO, B. G.; CORRIGAN, S.; CHARRY, J. M.;

BAILEY, W. H. Behavioral depression produced by an uncontrollable stressor: Relationship to norepinephrine, dopamine, and serotonin levels in various regions of rat brain. Brain Research Reviews, v.3, n.2, p.167–205, 1981. https://doi.org/10.1016/0165-0173(81)90005-9.

WESS, J.; NAKAJIMA, K.; JAIN, S. Novel designer receptors to probe GPCR signaling and physiology. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.34, n.7, p.385–392, 2013. https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.04.006.

WICKER, E.; FORCELLI, P. A. Chemogenetic silencing of the midline and intralaminar thalamus blocks amygdala-kindled seizures. Experimental Neurology, v.283, p.404–412, 2016.

https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.07.003.

ZAHORODNA, A.; BIJAK, M. An antidepressant-induced decrease in the responsiveness of hippocampal neurons to group I metabotropic glutamate receptor activation. *European Journal of Pharmacology*, v.386, n. 2–3, p. 173–179, 1999. https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00757-8.

ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission*, v.121, n. 8, p. 799–817, 2014. https://doi.org/10.1007/s00702- 014-1180-8.