

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LUANA APARECIDA CHAGAS

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR CB1 NAS RESPOSTAS HOMEOSTÁTICAS
INDUZIDAS POR ESTRESSE DE CONTENÇÃO**

**ALFENAS/MG
2024**

LUANA APARECIDA CHAGAS

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR CB1 NAS RESPOSTAS HOMEOSTÁTICAS
INDUZIDAS POR ESTRESSE DE CONTENÇÃO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção de título de Doutor em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas - MG. Área de concentração: Neuroendocrinologia básica e aplicada
Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Graciela Ruginsk Leitão

**ALFENAS/MG
2024**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Chagas, Luana Aparecida .

Participação do receptor cb1 nas respostas homeostáticas induzidas por estresse de contenção / Luana Aparecida Chagas. - Alfenas, MG, 2024.
63 f. : il. -

Orientador(a): Silvia Graciela Ruginsk Leitão.

Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Estresse de contenção . 2. Sistema endocanabinóide. 3. Receptor cb1.
4. Rimonabanto. I. Leitão, Silvia Graciela Ruginsk, orient. II. Título.

LUANA APARECIDA CHAGAS**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR CB1 NAS RESPOSTAS HOMEOSTÁTICAS INDUZIDAS POR ESTRESSE DE CONTENÇÃO**

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre/ Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neuroendocrinologia básica e aplicada.

Aprovada em: 11 de junho de 2024.

Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL/MG

Profa. Dra. Lívea Dornela Godoy

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP/USP

Profa. Dra. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL/MG

Prof. Dr. Wesley Fernandes Fonseca

Instituição: Universidade Estadual de Minas Gerais - UEMG

Prof. Dr. Renato Rizo Ventura

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL/MG



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Graciela Ruginsk Leitão, Professor(a) do Magistério Superior**, em 11/06/2024, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1265908** e o código CRC **657AD041**.

Dedico a finalização desta etapa a Deus, Nossa Senhora Aparecida e a São José e aos meus pais Roselena e José Adélio por todo apoio e força na realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida e a São José por segurar minhas mãos ao longo desta trajetória e nunca me deixar desistir apesar das adversidades.

Agradeço ao meus pais Roselena e José Adélio por me ajudarem a chegar até aqui, sempre me apoiando e incentivando para que conseguisse realizar sonhos como este.

À minha orientadora Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão, pela paciência e dedicação e por confiar no meu trabalho e me acolher em seu laboratório, tornando-se um grande exemplo de pessoa e pesquisadora e por me inspirar a fazer ciência de uma forma leve e resiliente. Minha eterna gratidão!

À secretária do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde Adriana Aparecida Pereira, pela paciência, simpatia e auxílio.

Agradeço também aos ratinhos que utilizamos nesse trabalho, pois sem eles nenhum resultado seria possível.

À CAPES e a FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal de Alfenas por abrir suas portas e fazer com que o sonho de me tornar Doutora se realizasse.

Agradeço a todos, embora aqui não citados, que contribuíram para a realização deste trabalho e sonho.

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

RESUMO

Os distúrbios relacionados ao estresse estão se tornando cada vez mais comuns e frequentemente associados a deficiências cognitivas. Neste contexto, o sistema endocanabinóide (SEC), particularmente o receptor canabinóide tipo 1 (CB1), parece desempenhar um papel decisivo na restauração da homeostase corporal. Há evidências consistentes na literatura de que a interrupção da neurotransmissão mediada por CB1 pode, em última análise, contribuir para doenças relacionadas ao estresse. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a participação dos receptores CB1 na integridade das respostas periféricas e comportamentais induzidas pelo estresse. Para tanto, ratos Wistar machos adultos foram submetidos a contenção física (1h/dia, durante 7 dias), seguida de administração única de rimonabanto (antagonista do receptor CB1, 3mg/Kg, intraperitoneal) ao final do protocolo de estresse. Os animais foram então submetidos à avaliação das respostas neuroendócrinas, testes comportamentais e quantificação da imunorreatividade do Iba-1 (microglial) nas subdivisões parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Não foram detectados efeitos do estresse de contenção ou da administração de rimonabanto na variação da massa corporal. No entanto, o estresse aumentou significativamente a massa relativa adrenal e a secreção de corticosterona e reduziu o tamanho relativo do timo. Os efeitos do estresse no tamanho da adrenal e nos níveis plasmáticos de corticosterona estavam ausentes em ratos tratados com rimonabanto, mas o tamanho do timo foi ainda mais reduzido no grupo de restrição com rimonabanto. O estresse por restrição também induziu anhedonia e reduziu o índice de reconhecimento de objetos, indicando comprometimento da recuperação da memória. O tratamento com o antagonista CB1 reverteu significativamente a anedonia induzida pelo estresse e o déficit de memória. No PVN, o estresse de restrição reduziu o número de células positivas para Iba-1 na região parvocelular medial de animais tratados com veículo, mas não com rimonabanto. Tomados em conjunto, estes resultados indicam que a inibição aguda da via endógena mediada por CB1 restaura comportamentos semelhantes à depressão induzidos pelo stress e perda de memória, sugerindo um papel para os endocanabinóides na interação neuro-imune-endócrina tanto a nível periférico como hipotalâmico.

Palavras-chave: Estresse de contenção; sistema endocanabinóide; receptor
CB1; rimonabanto.

ABSTRACT

Stress-related disorders are becoming increasingly common and are often associated with cognitive impairments. Within this context, the endocannabinoid (ECB) system, particularly the type 1 cannabinoid (CB1) receptor, seems to play a decisive role in restoring body homeostasis. There is consistent evidence in the literature that disrupted CB1-mediated neurotransmission can ultimately contribute to stress-related diseases. Therefore, the present study aimed to evaluate the participation of CB1 receptors in the integrity of stress-induced peripheral and behavioral responses. For this purpose, male adult Wistar rats underwent physical restraint (1h/day, for 7 days), followed by a single administration of rimonabant (CB1 receptor antagonist, 3mg/Kg, intraperitoneal) at the end of stress protocol. Animals were then subjected to evaluation of neuroendocrine responses, behavioral tests and quantification of Iba-1 (microglial) immunoreactivity in the parvocellular subdivisions of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). No effects of restraint stress or rimonabant administration were detected on body mass variation. However, stress significantly increased adrenal relative mass and corticosterone secretion, and reduced thymus relative size. The stress effects on adrenal size and corticosterone plasma levels were absent in rimonabant-treated rats, but the thymus size was further reduced in the restraint-rimonabant group. Restraint stress also induced anhedonia, a depression-like behavior, and reduced object recognition index, indicating memory recovery impairment. Treatment with the CB1 antagonist significantly reversed stress-induced anhedonia and memory deficit. In the PVN, restraint stress reduced the number of Iba-1 positive cells in the medial parvocellular region of vehicle- but not rimonabant-treated animals. Taken together, these results indicate that the acute inhibition of the CB1-mediated endogenous pathway restores stress-induced depression-like behaviors and memory loss, suggesting a role for endocannabinoids in the neuro-immune-endocrine interplay at both peripheral and hypothalamic levels.

Keywords: Restraint stress; endocannabinoid system; CB1 receptor; rimonabant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Resposta ao estresse mediada pela ativação do eixo hipotálamo- hipófise-adrenal	19
Figura 2 -	Representação esquemática de uma sinapse em que ocorre sinalização retrógrada pelos endocanabinóides.....	25
Figura 3 -	Delineamento experimental.....	35
Figura 4 -	Efeitos do estresse de contenção sobre o índice de preferência à sacarose	39
Figura 5 -	Efeitos do estresse de contenção sobre o índice de reconhecimento de objetos em.....	40
Figura 6 -	Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona	41
Figura 7 -	Efeitos do estresse de contenção na quantificação de Iba1 no núcleo do leito da estria terminal.	42
Figura 8 -	Fotomicrografias representativas da imunorreatividade a Iba-1 no <i>Bed Nucleus of Stria Terminalis</i> (BNST) de animais tratados com veículo ou rimonabanto	42
Figura 9 -	Efeitos do estresse de contenção e do tratamento com Rimonabanto sobre o número de células imunorreativas a Iba-1 no núcleo paraventricular do hipotálamo e nas subdivisões parvocelular ventral, dorsal cap e parvocelular medial.	43
Figura 10 -	Fotomicrografias representativas da imunorreatividade a Iba-1 no núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) de animais tratados com veículo ou rimonabant. 3V: terceiro ventrículo; V: região parvocelular ventral; MP: região parvocelular medial; DC: região parvocelular dorsal cap	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Delta do peso corporal, massa da adrenal, hipófise e timo do animais	38
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-araquidonil glicerol
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
AEA	anandamida
AMPA	Receptor de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazole propiônico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (Brain derived neurotrophic factor)
BNST	núcleo do leito da estria terminal
CB1	receptor canabinóide do tipo 1 CB2 receptor canabinóide do tipo 2
CEUA	Comitê de ética e utilização animal
CRH	hormônio liberador de corticotropina (corticotropin-releasing hormone)
DA	Discriminação Absoluta
dL	decilitro
ECB	endocanabinóide
EPM	erro padrão da média
FAAH	amida hidrolase de ácidos graxos (fatty acid amide hydrolase)
g	grama
GR	receptor glicocorticoide
HHA	hipotálamo hipófise adrenal
HPA	hipotálamo-pituitária-adrenal
Iba-1	molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado (ionized calcium binding adaptor molecule)
ip	intraperitoneal
IR	Índice de Reconhecimento
Kg	quilograma
MAGL	Monoacil Monoacilglicerol Lipase
mg	miligrama
mL	mililitro
min	minuto

NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
LTP	Potencialização de longo prazo (<i>Long term potentiation</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PaDC	parvocelular dorsal
PaMP	parvocelular medial
PaV	parvocelular ventral
POMC	pró-opiomelanocortina (proopiomelanocortin)
PVN	nucleo paraventricular
RO	reconhecimento de objetos
rpm	rotações por minuto
SEC	sistema endocanabinoide
SNC	sistema nervoso central
⊗9-THC	⊗9-tetrahydrocannabinol
μL	microlitro
μm	micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

- * - Asterisco
- °C - Graus célsius
- = - Igual
- + - Mais
- ± - Mais ou menos
- < - Menor
- > - Maior
- / - Por
- % - Porcentagem
- : - Proporção
- A - Alfa
- B - Beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	ESTRESSE.....	17
2.2	MANIFESTAÇÕES PATOLÓGICAS RELACIONADAS AO ESTRESSE.....	21
2.3	O SISTEMA ENDOCANABINÓIDE COMO MEDIADOR DAS AÇÕES DOS GLICOCOTICÓIDES.....	24
2.4	CIRCUITOS CEREBRAIS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA AO ESTRESSE.....	27
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	JUSTIFICATIVA.....	30
5	MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1	ANIMAIS.....	31
5.2	INDUÇÃO DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO.....	31
5.3	TRATAMENTO.....	31
5.4	AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE ANEDONIA PELO TESTE DE PREFERÊNCIA A SACAROSE.....	32
5.5	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE SOBRE A MEMÓRIA PELO TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	33
5.6	DOSAGEM DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA...	33
5.7	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IBA-1 POR IMUNOHISTOQUÍMICA.....	33
5.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	35
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
6	RESULTADOS.....	37
6.1	EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE O DELTA DE MASSA CORPORAL E INDICADORES DO EIXO HHA.....	37
6.2	EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE O ÍNDICE DE PREFERÊNCIA Á SACAROSE.....	38
6.3	EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE O ÍNDICE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	39
6.4	EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE CORTICOSTERONA.....	40

6.5	EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE A IMUNORRETIVIDADE A IBA-1 NO SNC.....	41
7	DISCUSSÃO	45
8	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	ANEXO A.....	40

1 INTRODUÇÃO

O estresse está cada vez mais presente em nossa vida diária, orientando respostas comportamentais, auxiliando na sobrevivência e moldando processos fisiológicos complexos. Ao nos depararmos com uma situação que ameaça nossa integridade, ocorre a ativação de uma série de processos, cuja finalidade é a de preparar o indivíduo para liquidar adequadamente o agente estressor causador da ameaça, reestabelecendo a homeostasia (De Sousa *et al*, 2015; Selye, 1946.)

É sabido que a exposição a estressores, a depender do contexto, das experiências anteriores e da interação entre elas, pode vir a se tornar um facilitador para o desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos (Ramamoorthy, *et al*, 2016). O estresse crônico é um dos principais causadores da depressão, distúrbio do qual há presença de humor deprimido, acompanhado de alterações cognitivas e somáticas que afetam significativamente a capacidade geral do indivíduo. A depressão é uma doença complexa, com subtipos e etiologias variados, bem como com tratamentos de eficácia e taxas de sucesso diversificadas (Bright *et al*, 2022; Kendler *et al*, 1999).

Aparentemente, a relação estresse-depressão está baseada na presença de altos níveis de cortisol, o hormônio do estresse, e pela neuroinflamação associada, a qual pode causar danos na estrutura e na função cerebral. Mais recentemente, foi demonstrado que os endocanabinóides (ECBs) atuam como intermediários das funções do cortisol, particularmente no sistema nervoso central (SNC) (Flodl, T. V, O'Keane, 2013). Ao se ligar ao receptor do tipo glicocorticoide (GR), expresso por neurônios do hipotálamo, o cortisol induz a síntese de ECBs a partir de lipídeos da membrana neuronal pós-sináptica. Agindo retrogradamente, os ECBs se ligam a receptores pré-sinápticos, particularmente do subtipo CB1, para induzir redução da liberação de glutamato, entre outras respostas. Como resultado, haveria redução da secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH), resposta esta que caracteriza a alça longa de retroalimentação negativa do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Essa descoberta contribuiu, nos últimos tempos, para alavancar a descoberta de potenciais novos alvos para o tratamento do estresse e dos distúrbios

psicológicos causados por ele, colocando o sistema ECB no centro destas atenções (Malcher-Lopes *et al*, 2003; Wochnik *et al*, 2005;).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica tem a finalidade de trazer o estado da arte a respeito do estresse, sua interação com o sistema endocanabinóide e quais são os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de transtornos psicológicos dentro deste contexto.

2.1 ESTRESSE

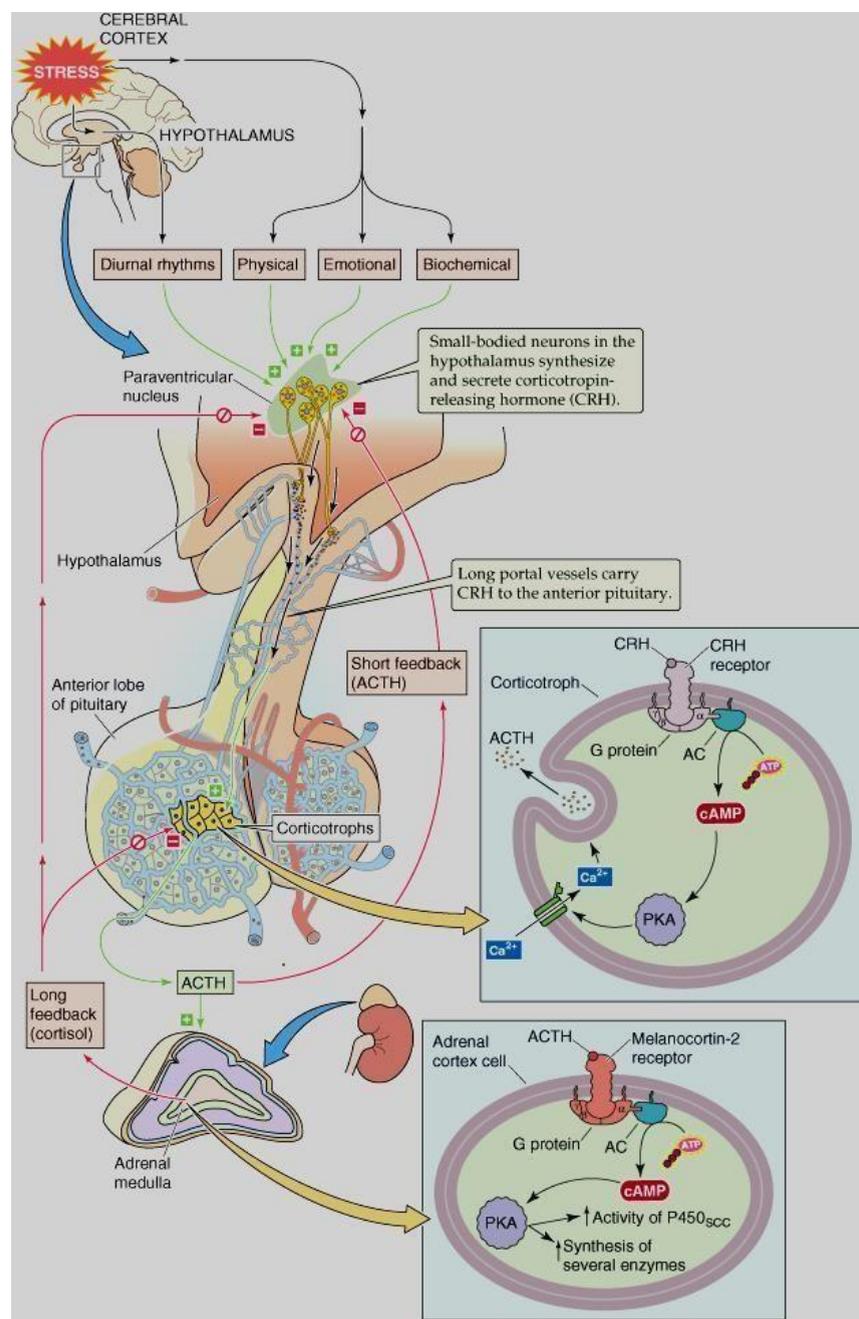
O enfrentamento das diversas situações cotidianas pode desencadear diferentes reações nos indivíduos, afetando aspectos sistêmicos e do SNC. Nessas situações, os indivíduos demonstram respostas gerais ou inespecíficas a ameaças externas ou internas, desenvolvendo respostas de caráter fisiológico e/ou psicológico (Margis *et al*, 2003).

Hans Selye (1956) foi o primeiro a utilizar o termo estresse ao descrever "uma resposta inespecífica do corpo a qualquer demanda" (Reynolds, 2013). Selye observou em vários estudos experimentais as consequências do estresse em animais experimentais quando expostos a vários estressores, como calor e mudanças comportamentais. Durante a investigação, descobriu-se que a resposta de luta ou fuga era apenas a primeira de uma série de outras respostas que o corpo produz quando era desafiado. Essa resposta fisiológica integrada ficou conhecida como Síndrome de Adaptação Geral (SAG) (Lee *et al.*, 2015).

A SAG é composta por um conjunto de respostas homeostáticas e alostáticas, sendo dividida em três fases: 1) a **fase de alerta**, em que há a resposta de luta ou fuga diante de uma situação desafiadora, tendo por finalidade mobilizar todos os recursos do organismo para enfrentar o agente estressor. Trata-se de resposta rápida e mediada pelo sistema nervoso autônomo simpático, que promove a ativação de diversos órgãos-alvo via secreção de adrenalina e noradrenalina; 2) **fase de resistência**, em que os agentes estressores se mantêm ativos, porém não fortes o suficiente para causar a morte, fazendo com que o organismo tente se adaptar ou eliminar o agente estressor. Nesta etapa, torna-se predominante a ativação do eixo HHA, com consequente liberação de glicocorticóides (Figura 1); 3) por fim, temos a **fase de exaustão**, durante a qual se manifestam alterações nas variáveis fisiológicas e

comportamentais. Inicialmente estas alterações seriam adaptativas, porém a ineficácia em eliminar o agente estressor produz uma sobrecarga energética e exaustão dos sistemas orgânicos, gerando danos irreparáveis, como o surgimento de doenças e até a morte (Orso *et al*, 2018; Pawlyk *et al*, 2005; Reynolds, 2013).

Figura 1- Resposta ao estresse mediada pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). O eixo HHA é regulado por mecanismos centrais que envolvem o sistema límbico e o hipotálamo. Os sinais atingem o núcleo paraventricular (PVN), com consequente secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH). O CRH atua nos corticotrofos hipofisários para estimular a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH tem como precursor a pró-opiomelanocortina (POMC), um pró-hormônio, cuja clivagem também dá origem a outros peptídeos bioativos. O ACTH liberado na circulação age em receptores de melanocortina do tipo 2 para estimular a glândula adrenal a produzir cortisol.



Fonte: Pawlyk *et al*, 2005.

O estresse pode se apresentar de formas variadas de um indivíduo para outro, assim como suas consequências e respostas ao agente estressor, uma vez que depende não somente de exposição a fatores de risco ambientais, como

também depende de predisposição genética. Sendo assim, a reação ao agente estressor pode compreender aspectos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que o organismo desenvolve diante de um desafio (positivo ou negativo) de natureza física ou psicossocial (Margis *et al*, 2003).

Modelos animais de estresse são comumente utilizados, já que, do ponto de vista translacional, sua extrapolação para seres humanos é razoável e, na maioria das vezes, representativa (Buynitsky e Mostofsky, 2009). Apesar de não haver um modelo animal que mimetize perfeitamente cada doença humana, existem endofenótipos que podem ser reproduzidos de forma independente nos animais, de acordo com os objetivos da investigação (Hasler *et al.*, 2004). Assim, existem algumas respostas que podem ser reconhecidas como representativas dos transtornos depressivos e ansiosos que se desenvolvem em humanos. Mesmo com críticas da sua aplicabilidade, é inegável a contribuição de tais modelos para uma melhor compreensão dos transtornos psiquiátricos e das opções para tratamentos farmacológicos (Jones *et al*, 2011).

Existem, na literatura, diversas formas de se categorizar os modelos de estresse. Eles podem ser diferenciados quanto ao tempo de exposição (agudo, subcrônico, crônico), quanto à homogeneidade do fator estressor (homotípico ou heterotípico), quanto à natureza do parâmetro fisiológico alterado pelo estressor (físico, químico, psicossocial, etc), entre outras formas. Um dos modelos de estresse, considerado como homotípico, consiste no uso de aparatos de contenção ou restrição física. É um modelo simples, indolor e não provoca uma debilidade duradoura. Mesmo sendo um procedimento físico, é considerado também um importante modelo de estresse psicossocial (Buynitsky e Mostofsky, 2009).

O desafio para a escolha do modelo consiste em selecionar aquele que, ao mesmo tempo, induza alterações importantes no eixo HHA, e seja apresentado por um tempo insuficiente para causar adaptação do organismo (alostase). Isso porque os efeitos da exposição previsível e repetida a estressores homotípicos, como a contenção física, podem levar a uma habituação nas respostas hormonais e comportamentais (Kant, *et al.*, 1985).

Estudos sobre os mecanismos de habituação a agentes estressores têm destacado o papel dos glicocorticoides e dos endocanabinóides neste processo, como veremos a discutir posteriormente (Kamprath *et al*, 2006; Patel *et al*, 2005;). Já foi demonstrado que o modelo de contenção física é eficiente em induzir sintomas depressivos e ansiosos, bem como alterações cognitivas (SHI *et al*, 2003). Em estudo realizado por Chiba e colaboradores (2012), a exposição prolongada a estresse de contenção (6 horas por dia durante 28 dias) produziu comportamentos do tipo ansioso e depressivo em ratos. Efeitos semelhantes foram obtidos com protocolos de menor duração, utilizando contenção física por 2 horas diárias em 7 dias consecutivos (Lee e Noh, 2015).

O estresse de contenção também provocou aumento no tempo de imobilidade em teste de nado forçado, um indicativo de comportamento semelhante à depressão em roedores (Gibney *et al*, 2014). Os animais experimentais também apresentaram elevação nos níveis circulantes de corticosterona, expressão e ativação hepática da enzima triptofano 2,3-dioxigenase, além do aumento de sua expressão no córtex cerebral.

2.2 MANIFESTAÇÕES PATOLÓGICAS RELACIONADAS AO ESTRESSE

Embora os glicocorticóides mediem grande parte das respostas homeostáticas e alostáticas ao estresse, pouco se sabe sobre como e quando estes efeitos se tornam prejudiciais ao organismo (Nestler. EJ; Krishnan. V, 2008). Assim, o estresse crônico é apontado como a causa de diversos distúrbios, os quais impactam negativamente na qualidade de vida e na longevidade do indivíduo (Von Borell *et al*, 2001), incluindo o desenvolvimento de ansiedade e depressão, alterando circuitos funcionais da amígdala e do córtex pré-frontal (Reynolds, 2013). Porém, nem sempre a relação entre estresse e doença foi bem caracterizada, uma vez que existe uma linha tênue entre o que pode ser considerada uma resposta benéfica (protetora) do organismo ao estresse e o que pode ser deletério.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2022, o Brasil ocupou o primeiro lugar entre os países com maior prevalência de depressão na América Latina, além de ser o segundo país com maior prevalência nas Américas. A prevalência de depressão ao longo da vida no Brasil gira em torno

de 15,5%, apresentando uma taxa de 11,9% do total de tempo de incapacidade durante a vida. Seu aparecimento é predominante na terceira década da vida, particularmente em mulheres, porém é cada vez mais comum seu surgimento em idades mais precoces (OMS, 2022).

Assim, a depressão tornou-se um dos transtornos psiquiátricos mais graves da atualidade, colocando em risco a saúde física e psicológica da população global e contribuindo significativamente para o aumento da taxa de suicídio no século XXI (Hao *et al*, 2019). A depressão se caracteriza como um transtorno mental associado a sentimentos de incapacidade, perda de prazer em situações antes consideradas prazerosas (anedonia), isolamento social, irritabilidade, pessimismo, déficit cognitivo (memória e raciocínio) e tristeza profunda. Ela afeta capacidades básicas do dia a dia como trabalhar, socializar, dormir, estudar, estando associada, em muitos casos, a transtornos de ansiedade e doenças neurodegenerativas (Hauenstein, 2003; Yang *et al*, 2015).

Além da depressão, o estresse pode contribuir no aparecimento de transtornos de ansiedade, o qual é caracterizado por uma sensação desagradável de medo, apreensão, caracterizado por tensão e desconforto derivado de antecipação de perigo ou algo desconhecido (OMS,2019).

A ansiedade começou a ser estudada em 1895, quando Freud escreveu sobre a 'neurose de ansiedade' e identificou duas fases. A primeira é a saudável que surge de um sentimento difuso de medo e a segunda é a do sentimento aterrorizante (Lee, *et al*. 2015).

Ao contrário da ansiedade normal, a ansiedade patológica também pode causar prejuízos laborais ao indivíduo e em suas atividades diárias, gerando uma sensação de impotência diante das situações, dificultando o enfrentamento dos eventos geradores de ansiedade. (Margis, *et al*. 2003).

A ansiedade afeta não apenas a forma como uma pessoa pensa, mas também pode levar a sintomas físicos e pode ocorrer quando uma pessoa encontra dificuldade para controlar o medo durante vários dias mantendo-se por um período superior a seis meses e apresentar algum outro sintoma como irritabilidade, dores de cabeça, sudorese, fadiga, falta de concentração, surgimento de tremores ou tensão muscular (Wadhwa *et al.*, 2004).

Por fim, não é raro associar eventos estressantes a prejuízos no aprendizado e consolidação dos conhecimentos. De maneira bastante sintética, existem dois diferentes tipos de memória, a curto prazo ou memória operacional, e a de longo prazo, esta última dependente da ocorrência de um fenômeno sináptico no hipocampo denominado Long Term Potentiation (LTP). A LTP se caracteriza, portanto, como um processo neurofisiológico que está associado com eventos sinápticos envolvendo o neurotransmissor glutamato e seus receptores do tipo AMPA e NMDA. Em conjunto, essas alterações tornam os neurônios mais sensíveis a uma futura ativação, permitindo a evocação da memória armazenada. Se, por outro lado, essa memória não é acionada ao longo do tempo, a rota sináptica formada passa pelo processo inverso, culminando na dissipação daquela memória (Guyton e Hall, 2017; Kandel *et al.*, 2014).

As falhas nos mecanismos de aquisição, consolidação ou evocação das memórias são conhecidas como amnésia. Caracteriza-se como amnésia retrógrada a perda de capacidade de recordar acontecimentos prévios a um evento-chave, enquanto a amnésia anterógrada se manifesta pela incapacidade de recordar fatos posteriores ao evento amnésico (Guyton e Hall, 2017; Kandel *et al.*, 2014).

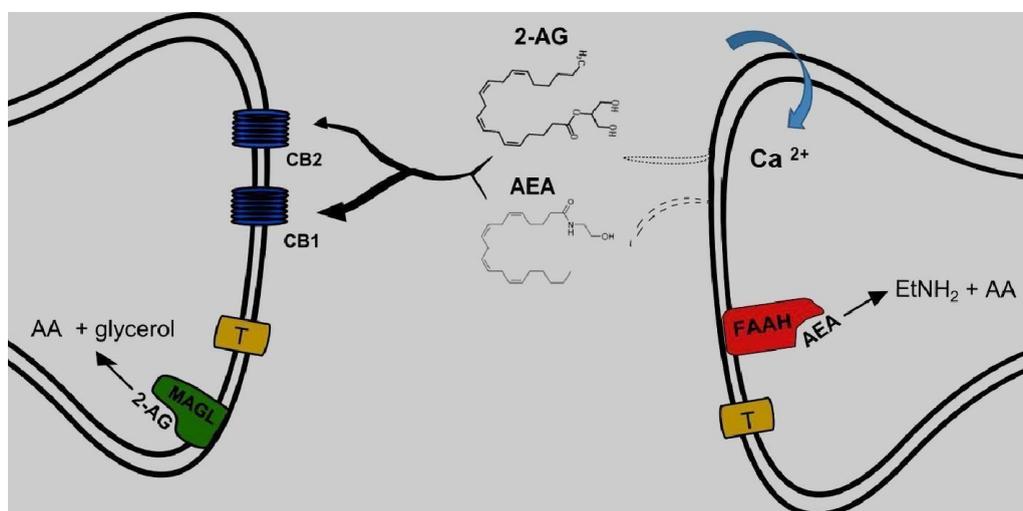
Durante o estresse, a ação dos glicocorticóides para promover efeitos nocivos sobre a cognição é complexa. Sabe-se que um dos fatores é a redução da afinidade da proteína Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) pelo seu receptor. O BDNF tem influência sobre processos celulares de sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica. A sua redução, conjuntamente a outros processos, como a queda na atividade e volume da massa cinzenta e na densidade de células gliais, está ligada a quadros de sintomas depressivos. Além do mais, o cortisol/corticosterona e a adrenalina sabidamente interferem no processo de aquisição de memória, apresentando efeitos dependentes do tempo de exposição e a características do indivíduo exposto (Chiba *et al.*, 2012).

2.3 O SISTEMA ENDOCANABINÓIDE COMO MEDIADOR DAS AÇÕES DOS GLICOCORTICÓIDES

Como destacado anteriormente, o sistema endocanabinóide (SEC) atua como intermediário em várias ações dos glicocorticoides, particularmente no SNC. Portanto, o SEC desempenha um papel importante na sintonia de muitos processos cognitivos e fisiológicos, sendo composto por canabinóides endógenos (ECB), receptores canabinóides e enzimas responsáveis pela síntese e degradação destes compostos.

Até o momento, foram identificados dois receptores canabinóides: o CB1, amplamente expresso no SNC, particularmente em sinapses hipocampais, e o receptor CB2, encontrado nos órgãos do sistema imunológico, estando predominantemente envolvido com a ativação de vias inflamatórias centrais (Metna-Laurent *et al*, 2014). Os ligantes endógenos para os receptores CB1 e CB2 são produzidos a partir de fosfolípides de membrana, sendo os principais o aracdonoil etanolamida (também denominada anandamida) e o 2-aracdonoil glicerol (2-AG). Esses mediadores são liberados dos neurônios pós-sinápticos, após uma despolarização, ativando receptores pré-sinápticos, atuando, pois, como mensageiros retrógrados (Figura 2) (Engeli, 2008; Godoy-Matos *et al*, 2006;).

Figura 2 - Representação esquemática de uma sinapse em que ocorre sinalização retrógrada pelos endocanabinóides. Anandamida (AEA) e 2- araquidonoilglicerol (2-AG) são sintetizados em neurônios pós-sinápticos, após influxo de cálcio. Estes exercem suas ações ao se ligar a receptores CB1 e CB2 expressos em neurônios pré-sinápticos. O término da ação destes mediadores ocorre após recaptação e metabolização pela Hidrolase Amida de ácidos graxos (FAAH) e pela Monoacilglicerol Lipase (MAGL) que hidrolisam AEA e 2-AG respectivamente.



Fonte: BATISTA *et al*, 2014.

Ao contrário do que ocorre com neurotransmissores clássicos, que são sintetizados e estocados em vesículas, os ECBs são sintetizados sob demanda e agem como mensageiros retrógrados em receptores expressos pelos terminais pré-sinápticos. Já a degradação desses mediadores é realizada por vias enzimáticas específicas, sendo a monoacilglicerol lipase (MGL) responsável por hidrolisar o 2-AG, e a hidrolase de amida de ácidos graxos (FAAH) responsável por degradar a anandamida (Fitzgerald, Shobin *et al*, 2012; Howlett, Barth *et al*, 2002; Straiker, Hu *et al*, 2009).

O SEC surge como um sistema de sinalização cerebral complexo e difuso que desempenha um importante papel nas funções afetivas, cognitivas e transtornos psicóticos e pode ser o alvo para a descoberta de vários compostos terapêuticos (Di Marzo *et al*, 2010). Nesse sentido, o SEC está atualmente em grande evidência, tendo em vista que os receptores canabinóides são também o alvo principal do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), um dos princípios ativos da planta *Cannabis sativa* (Lu *et al*, 2020), que tem grande potencial para uso terapêutico em distúrbios neuropsiquiátricos e neurodegenerativos.

O SEC influencia diretamente a geração de ansiedade, o comportamento alimentar, comportamento emocional e a depressão, participando de funções nervosas, neurogênese, neuroproteção, recompensa, cognição, na aprendizagem e na memória, dentre outros processos fisiológicos importantes (Lowe *et al*, 2021). O receptor CB1 está entre os receptores acoplados à proteína G mais expressos no SNC. Já foi demonstrada sua participação em uma grande variedade de funções relacionadas ao desenvolvimento, desde a sobrevivência neuronal as funções astrogliais complexas, incluindo a neuroproteção (Yl *et al*, 2011). Assim, os receptores CB1 gliais emergem recentemente como mediadores de várias formas de plasticidade sináptica associado a importantes funções cognitivas (Oberheim *et al*, 2012).

Interessantemente, os receptores canabinóides são expressos não somente em neurônios, mas também em células da glia. Assim, o SEC também contribui de maneira decisiva para a homeostase da sinapse tripartite, composta pelos terminais pré e pós-sinápticos e pelos processos gliais. O “dogma neuronal”, que partia do pressuposto que os neurônios eram as únicas células do SNC a contribuir nestes processos, foi preponderante nos estudos em Neurociências até a primeira metade do século XIX, quando as células da glia foram identificadas (Araque *et al.*, 2014).

Depois de uma lacuna grande de tempo desde a sua descoberta, as células gliais passaram, na última década, a ter papel de destaque em muitos processos fisiológicos e patológicos associados ao desenvolvimento de distúrbios neuropsiquiátricos, particularmente no substrato neuroimunoendócrino subjacente a certas doenças (Metna-Laurent *et al*, 2014).

A microglia corresponde à maior parte das células imunes presentes no SNC e regula processos importantes, como a neurogênese no hipocampo, demonstrada em diversos estudos. Neste sentido, a microglia mantém o ambiente de nicho neurogênico por meio de sua capacidade fagocítica e interação com neurônios por meio da sinalização fractalkine-CX3CR1 (Araki *et al*, 2021). Além disso, a microglia secreta fatores de crescimento e citocinas para apoiar o desenvolvimento de novos neurônios no hipocampo. No entanto, os mecanismos moleculares exatos pelos quais a microglia regula a neurogênese

e contribui para a transtornos psiquiátricos ainda não foram elucidados (Cope et al, 2019).

2.4 CIRCUITOS CEREBRAIS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA AO ESTRESSE

A importância do PVN na ativação das respostas endócrinas e pré-autonômicas ao estresse é intuitiva, visto que este núcleo hipotalâmico abriga não somente os neurônios parvocelulares produtores de CRH, o primeiro hormônio do eixo HHA, como também neurônios parvocelulares que se projetam a áreas bulbares, influenciando o controle do tônus simpático, assim como outras funções vegetativas (Daviu *et al*, 2020; Fuzesi *et al*, 2016;). A importância deste núcleo já foi destacada anteriormente neste texto, com foco no controle neuroendócrino da produção de cortisol/corticosterona (Andries *et al* 2021, Benarroch, 2005; Vale *et al*, 1981;).

Além do PVN, gostaríamos de destacar a participação do *Bed Nucleus da Stria Terminalis* (BNST) nas respostas comportamentais e endócrinas ao estresse. Evidências sugerem que o BNST desempenha um papel importante na regulação de traços de ansiedade, assim como na formação do medo contextual e da memória, bem como participa da regulação do comportamento apetitivo e aversivo. Acredita-se que as sub-regiões e os diferentes tipos de células do BNST modulam a ansiedade de formas opostas, criando circuitos opostos cujas forças relativas determinam o resultado comportamental final. Por meio desta aparente ambiguidade, o estresse poderia afetar os circuitos de forma diferencial, mudando o equilíbrio de um estado ansiolítico para um estado ansiogênico.

O BNST pode ser subdividido em pelo menos 16 sub-regiões únicas, sendo descrito como uma das estruturas mais complexas do SNC (Larriva, 2006). Aqui daremos enfoque ao grupo lateral anterior do BNST, pois está amplamente conectado com hipotálamo, mesencéfalo, amígdala e regiões inferiores do tronco cerebral associadas à função autonômica, processamento emocional, dor e recompensa (Jalabert *et al*. 2009; Jennings *et al*, 2013; Turesson *et al*., 2013).

De acordo com Dong e Swanson (2014), o grupo lateral anterior do BNST, consiste em núcleos ovais, fusiformes, rombóides e justacapsulares, bem como na região indiferenciada que envolve esses núcleos denominada área anterolateral. As sub-regiões do BNST recebem diferentes aferências, têm projeções distintas e, além disso, apresentam uma grande conectividade dentro e entre seus núcleos menores. Grande parte dos neurônios do BNST usa ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmissor primário (Csáki *et al*, 2000).

Os neurônios no BNST expressam uma vasta gama de neuropeptídeos, entre eles o próprio CRH, sugerindo que o estresse possa fornecer um controle dinâmico sobre o sistema, modulando a plasticidade sináptica e resultando em mudanças duradouras no estado comportamental (Walter *et al*, 1991). De fato, o BNST demonstrou ser um importante local de ação para o CRH na potencialização de comportamentos semelhantes à ansiedade e na resposta ao estresse (Dabrouska *et al*, 2013. Sahuque *et al*, 2006). Nesse sentido, foi demonstrado que o choque agudo nas patas de roedores é capaz de induzir aumento da expressão do RNA mensageiro para CRH neste núcleo, fortalecendo essa hipótese (Funk *et al*, 2006. Makino, *et al*.1994).

3 OBJETIVOS

A seguir serão apresentados os objetivos gerais e específicos do presente trabalho:

3.1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo central do presente estudo é elucidar a participação do receptor CB1 na integridade das respostas adaptativas em animais submetidos a estresse de contenção.

3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, em animais submetidos ao protocolo de contenção física por 60 minutos durante 7 dias, os efeitos do tratamento agudo com um antagonista dos receptores CB1 (Rimonabanto) sobre:

- a) o desenvolvimento de estresse, por meio da determinação das concentrações plasmáticas de corticosterona;
- b) o desenvolvimento de anedonia, por meio da avaliação da preferência por sacarose;
- c) a memória, por meio do teste de reconhecimento de objetos;
- d) a expressão de Iba-1, um marcador de micróglia, em áreas relacionadas à função de memória e ao controle do eixo HHA.

4 JUSTIFICATIVA

Atualmente, distúrbios relacionados ao estresse vêm se tornando cada vez mais frequentes e causam impacto cada vez maior na vida das pessoas, já que estão associados com perturbações de ordem pessoal, social e econômica (laboral). Com a finalidade de elucidar como o estresse afeta o corpo humano, bem como seus mecanismos de ação e respostas adaptativas associadas, muitos estudos têm se concentrado sobre a função do eixo HHA. Neste contexto, o SEC tem sido apontado como um importante mediador central das ações induzidas pelos glicocorticoides. Entretanto, poucos estudos da literatura têm detalhado a dinâmica de interação entre o receptor CB1 e a função glial relacionada ao estresse, sendo este o objetivo central do presente trabalho.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 116 ratos Wistar adultos, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Alfenas/MG, pesando inicialmente 250g. Os animais foram mantidos em ambiente com luz (ciclo claro/escuro de 12 horas), temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($55 \pm 10\%$) controladas. Os animais foram habituados por, pelo menos, 72 horas com livre acesso a água filtrada e ração padrão. Durante o experimento, a massa corporal dos animais foi aferida diariamente, sempre no mesmo horário do dia. Todos os procedimentos foram conduzidos em acordo ao “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH Publicação Nº 85-23, revisado 1996), respeitando-se os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL; acessado de <<http://www.cobea.org.br>> em 26/11/2013). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UNIFAL/MG sob protocolo 0030/2020 (Anexo A).

5.2 INDUÇÃO DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO

Para indução de estresse, foi utilizado o modelo de contenção física. Para tanto, os animais foram colocados em cilindro de plástico transparente, com dimensões de 20 cm de comprimento e 8 cm de diâmetro, contendo orifícios para ventilação. Após a colocação do animal, o tubo foi vedado nas extremidades e posicionado sobre superfície plana, longe de ruídos e outros fatores estressantes. Os animais permaneceram contidos durante 60 minutos diariamente por 7 dias. O procedimento foi realizado sempre no mesmo horário e pelo mesmo manipulador.

5.3 TRATAMENTO

Para análise da participação do receptor CB1 nas respostas integradas ao estresse de contenção, os animais receberam injeção 1 hora e 30 minutos antes de cada teste de 5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-N-1-

piperidinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (Rimonabanto), um antagonista deste tipo de receptor, na dose de 3 mg/kg por via intraperitoneal. Nos animais controle, foi administrado volume equivalente de veículo (etanol 5% diluído em NaCl 0,9%).

5.4 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE ANEDONIA PELO TESTE DE PREFERÊNCIA A SACAROSE

Ao final de 7 dias de estresse de contenção, os animais foram avaliados quanto à presença de anedonia pelo teste de preferência à sacarose. Para tanto, os animais foram habituados com uma solução de sacarose a 5% (p/v) no dia anterior à avaliação por 1h/dia. No dia do teste, eles tiveram acesso à mesma solução de sacarose ou água por um período total de 24h. Ao final deste período, foi estimada a preferência à sacarose (expressa em %), dividindo-se o volume ingerido de solução de sacarose pela ingestão líquida total (solução de sacarose + ingestão de água).

5.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE SOBRE A MEMÓRIA PELO TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

O teste de reconhecimento de objetos (RO) avalia a habilidade do roedor em reconhecer um objeto previamente explorado na presença de um novo objeto não conhecido. Dois dias antes do teste, os animais foram expostos à caixa teste (15 minutos) para a habituação, para garantir que os animais passem quantidade suficiente de tempo explorando os objetos e não o ambiente. O teste foi realizado em uma arena quadrada (60 cm x 60 cm). No dia do teste os animais foram apresentados a 2 objetos idênticos (A e B) durante 10 minutos (treinamento); 24 horas após o treinamento um dos objetos familiares foi substituído por um novo objeto (objeto novo). Todos os objetos apresentaram texturas, tamanhos e formas distintas. Os ratos foram colocados individualmente na arena e seu comportamento foi filmado por 10 minutos para análise subsequente. Entre os testes, os objetos e a arena foram devidamente limpos com álcool 70%. A exploração foi caracterizada quando o animal cheirou ou tocou o objeto com o

nariz. O tempo gasto pelo animal explorando os dois objetos (objeto familiar ou novo) foi tomado como uma medida de exploração de objetos. A partir dos tempos de exploração, foram calculados, para cada animal, dois parâmetros para análise e comparação dos grupos. O primeiro parâmetro foi a Discriminação Absoluta (DA), que avalia a diferença dos tempos de exploração do objeto novo (T_{on}) e do conhecido (T_{oc}), obtida através da equação a seguir:

$$\text{Discriminação Absoluta (segundos)} = T_{on} - T_{oc}$$

O segundo parâmetro foi o Índice de Reconhecimento (IR), um valor em porcentagem que relaciona o tempo gasto com o objeto novo (T_{on}) perante o tempo total de exploração, que foi obtido pela equação:

$$\text{Índice de Reconhecimento (\%)} = \frac{T_{on}}{T_{on} + T_{oc}} \times 100.$$

5.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA

Para a coleta de sangue, foram utilizados os mesmos animais que passaram pelo teste de RO. Para tanto, eles foram eutanasiados com dose letal de isoflurano e o sangue foi coletado do tronco (5 mL), em tubos plásticos heparinizados, mantidos em gelo. O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 4°C, 20 min) e as alíquotas mantidas a -20°C até o momento da dosagem hormonal.

Inicialmente, as amostras foram extraídas. Para tanto, a 25 µL do plasma foi adicionado um volume de 1 mL de etanol absoluto, seguido de agitação por 15 segundos. Posteriormente, as amostras foram submetidas a centrifugação (2500 rpm, 4°C, 15 minutos). O sobrenadante foi vertido em outro tubo devidamente identificado e submetido à liofilização (*Labconco, Centrizap*). Para o radioimunensaio, as amostras foram reconstituídas com tampão e ensaiadas em duplicata, conforme protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Neuroendocrinologia da FMRP-USP. As concentrações plasmáticas de corticosterona foram expressas em µg/dL.

5.7 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE SOBRE A EXPRESSÃO DE IBA-1 POR IMUNOISTOQUÍMICA

No último dia de protocolo, os animais foram tratados com Rimonabanto e submetidos à contenção física. Noventa minutos após, os animais foram anestesiados com mistura de cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) e cloridrato de cetamina (90 mg/Kg), em um volume de 0,1 mL de solução para 100g de massa corporal. Os animais foram então perfundidos com 150 mL de tampão fosfato salina 0,01M, seguidos por 350 mL de solução de formaldeído a 4%. Em seguida, os encéfalos foram removidos e mantidos em temperatura ambiente por 24h sob agitação em solução fixadora. Após este período, os encéfalos foram transferidos para solução de sacarose a 30%, na qual permaneceram durante aproximadamente 36 horas a 4° C, e cortados em criostato na espessura de 30 µm.

Considerando a relação entre estresse e neuroinflamação, foi realizada a imunomarcagem para uma proteína expressa unicamente por células da micróglia (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*, Iba-1). Para tanto, utilizou-se da técnica de imunistoquímica, realizada em secções coronais da região do hipotálamo e BNST (*free floating*). Inicialmente, os cortes foram submetidos ao procedimento de inibição da peroxidase endógena, seguido do bloqueio das ligações inespecíficas com albumina bovina a 10% por 1h. Após esse período, os cortes foram incubados *overnight* em temperatura ambiente com o anticorpo primário anti-Iba-1 (rabbit, 1:500, Wako→, #019-19741). Após período de incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados (3x) em PBS (0,01M) e, na sequência, incubados com o anticorpo secundário donkey anti-rabbit na concentração de 1:250 (Jackson ImmunoResearch®, #711-005-152) por um período mínimo de 1h. Após esta etapa, os cortes foram lavados (3x) com PBS (0,01M) e incubados com a solução ABC por 1h (1:1000, Vector→, #PK-6100). Em seguida, os cortes foram lavados e colocados para reagir por tempo variável em solução de diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich→, #D5637). Os cortes foram então montados sobre lâminas gelatinizadas, secados em temperatura ambiente e receberam cobertura de lamínula para análise e captura das imagens nas regiões de interesse. As principais subdivisões parvocelulares do PVN foram identificadas de acordo com o atlas cerebral de ratos (Paxinos e Watson, 2013): Medial (PaMP), dorsal cap (PaDC) e ventral (PaV) (- 1,80 mm posterior ao bregma). A porção lateral do BNST, por sua vez,

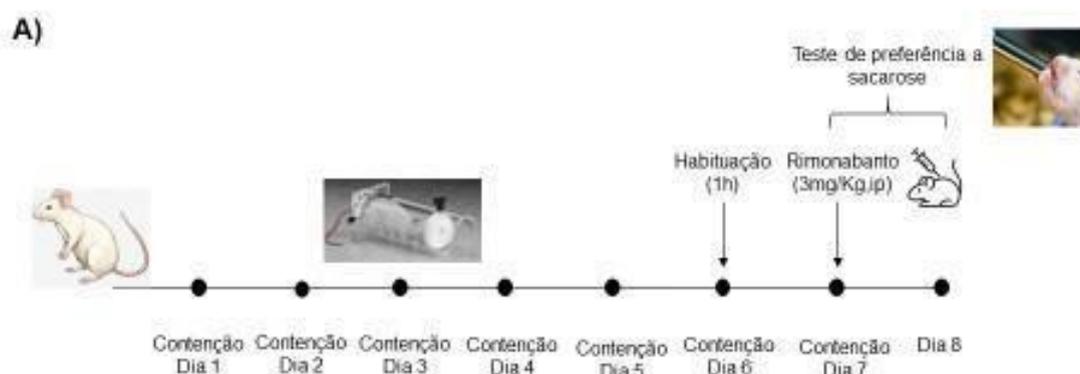
foi analisada a 0,2 mm anterior ao bregma. O número de células imunorreativas a Iba-1 foi contado manualmente por dois participantes cegos às condições experimentais com o auxílio de um microscópio Nikon (modelo Eclipse 80i) equipado com câmera digital. Fotomicrografias representativas das diversas condições experimentais foram adquiridas com ampliação de 20X.

5.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Delineamento experimental utilizado no presente estudo, mostrando o total de 3 coortes de animais experimentais. A coorte 1 (Figura 3A) foi utilizada para avaliação do teste de preferência de sacarose, enquanto a coorte 2 (Figura 3B) foi submetida ao teste de reconhecimento de objetos (OR), ao final do qual os animais foram eutanasiados para coleta de tecidos (sangue e amostras de glândulas/órgãos). Por fim a coorte 3 (Figura 3C) foi submetida à perfusão cardíaca para coleta cerebral e análise da imunorreatividade do Iba-1 no paraventricular núcleo do hipotálamo.

Figura 3 - Desenho experimental dos experimentos realizados na pesquisa, demonstrando como os animais foram utilizados em cada teste.

Teste de preferência a sacarose



Teste de Reconhecimento de objetos

B)



Perfusão e remoção de encéfalos para imuno-histoquímica

C)



Fonte: da autora.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise foi realizada por meio do teste de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do pós-teste de Tukey, usando-se o programa Graphpad Prism → versão 8.0. Foram consideradas como variáveis a presença de estresse e o tratamento com o antagonista CB1. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$, bicaudal).

6 RESULTADOS

6.1 EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE O DELTA DE MASSA CORPORAL E INDICADORES DO EIXO HHA

Conforme evidenciado na Tabela 1, o peso corporal, avaliado diariamente, não se mostrou estatisticamente diferente entre os grupos estudados, em nenhum dos tempos avaliados. Tampouco houve efeito significativo se compararmos os grupos quanto ao delta de peso corporal (subtraindo-se do peso do sétimo dia o peso corporal inicial do experimento). Tampouco foram observados efeitos do estresse ou do tratamento com rimonabanto sobre a massa da hipófise.

No entanto, em animais tratados com veículo, o estresse de contenção aumentou significativamente o índice adrenal [$F(1, 38) = 10,16, p < 0,01$] e reduziu o tamanho relativo do timo [$F(1, 9) = 21,43, p < 0,05$]. Curiosamente, o tratamento com rimonabanto, sozinho, diminuiu o tamanho do timo [$F(1, 9) = 22,12, p < 0,05$]. O efeito inibitório do rimonabanto sobre a massa relativa do timo foi ainda maior, do ponto de vista estatístico, no grupo submetido à contenção ($p < 0,001$). Considerando-se o índice adrenal, o tratamento com rimonabanto atenuou este parâmetro nos animais estressados, porém o efeito não foi detectado, do ponto de vista estatístico, em relação ao grupo não tratado.

Já ao avaliar a massa da adrenal, pudemos observar que o grupo contenção veículo apresentou um aumento quando comparado ao grupo controle veículo [$F(1, 38) = 10,16, p < 0,001$]. O grupo controle veículo também apresentou uma redução da massa da adrenal quando comparado ao grupo contenção veículo [$F(1, 38) = 0,39, p < 0,05$].

A massa do timo do grupo contenção veículo apresentou uma redução quando comparado ao grupo controle veículo [$F(1, 9) = 0,77, p < 0,05$]. O grupo contenção rimonabanto também apresentou uma redução da massa do timo comparada a massa do grupo controle veículo [$F(1, 9) = 22,12, p < 0,0001$], resultado semelhante foi observado ao comparar o grupo controle rimonabanto com o grupo controle veículo [$F(1, 9) = 0,77, p < 0,05$].

Tabela 1 - Delta do peso corporal (g) e massas da adrenal (mg/100g de massa corporal), hipófise (mg/100g de massa corporal) e timo (mg/100g de massa corporal) de animais controle ou submetidos a estresse de contenção, tratados com veículo (etanol 5% diluído em NaCl 0,9%) ou Rimonabanto (3 mg/Kg, i.p.).

Variável	Grupo	Tratamento	
		Veículo	Rimonabanto
Delta peso corporal	Controle	18,83 ± 1,24	22,75 ± 0,82
	Contenção	18,50 ± 2,46	20,71 ± 1,45
Adrenal	Controle	9,42 ± 0,34	10,51 ± 0,62
	Contenção	13,77 ± 1,33**	11,62 ± 0,67
Hipófise	Controle	3,47 ± 0,61	2,61 ± 0,23
	Contenção	2,32 ± 0,11	2,68 ± 0,19
Timo	Controle	22,17 ± 0,77	17,09 ± 0,12#
	Contenção	17,16 ± 1,24*	13,68 ± 0,51###

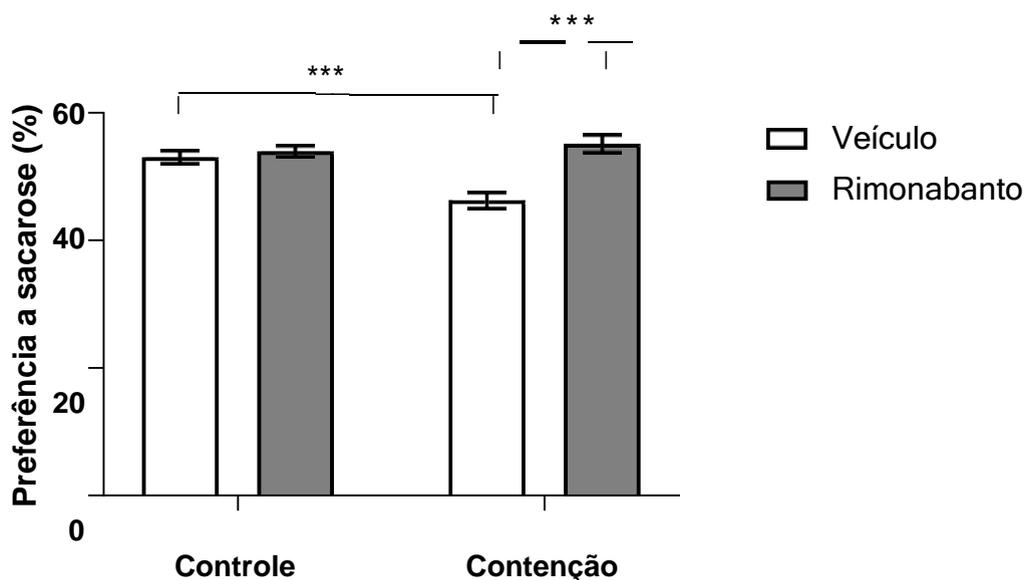
Fonte: Da autora.

Resultados expressos em média ± EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey # $p < 0,05$ versus grupo controle + veículo; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus grupo controle + veículo; # $p < 0,001$ versus grupo contenção + veículo.

6.2 EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE O ÍNDICE DE PREFERÊNCIA À SACAROSE

Como pode ser observado na Figura 4, o estresse de contenção reduziu significativamente o índice de preferência à sacarose nos animais tratados com veículo [$F(1, 22) = 6,33$, $p < 0,001$]. Ademais, o tratamento com Rimonabanto preveniu significativamente este efeito, trazendo o índice de preferência no grupo Rimonabanto + contenção para valores semelhantes aos animais sem estresse [$F(1, 22) = 19,81$, $p < 0,001$].

Figura 4 - Efeitos do estresse de contenção sobre o índice de preferência à sacarose em animais controle ou submetidos a estresse de contenção, tratados com veículo (etanol 5% diluído em NaCl 0,9%) ou Rimonabanto (3 mg/Kg, i.p.). Resultados expressos em média ± EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. *** $p < 0,001$ versus grupo veículo + controle ou veículo + contenção.

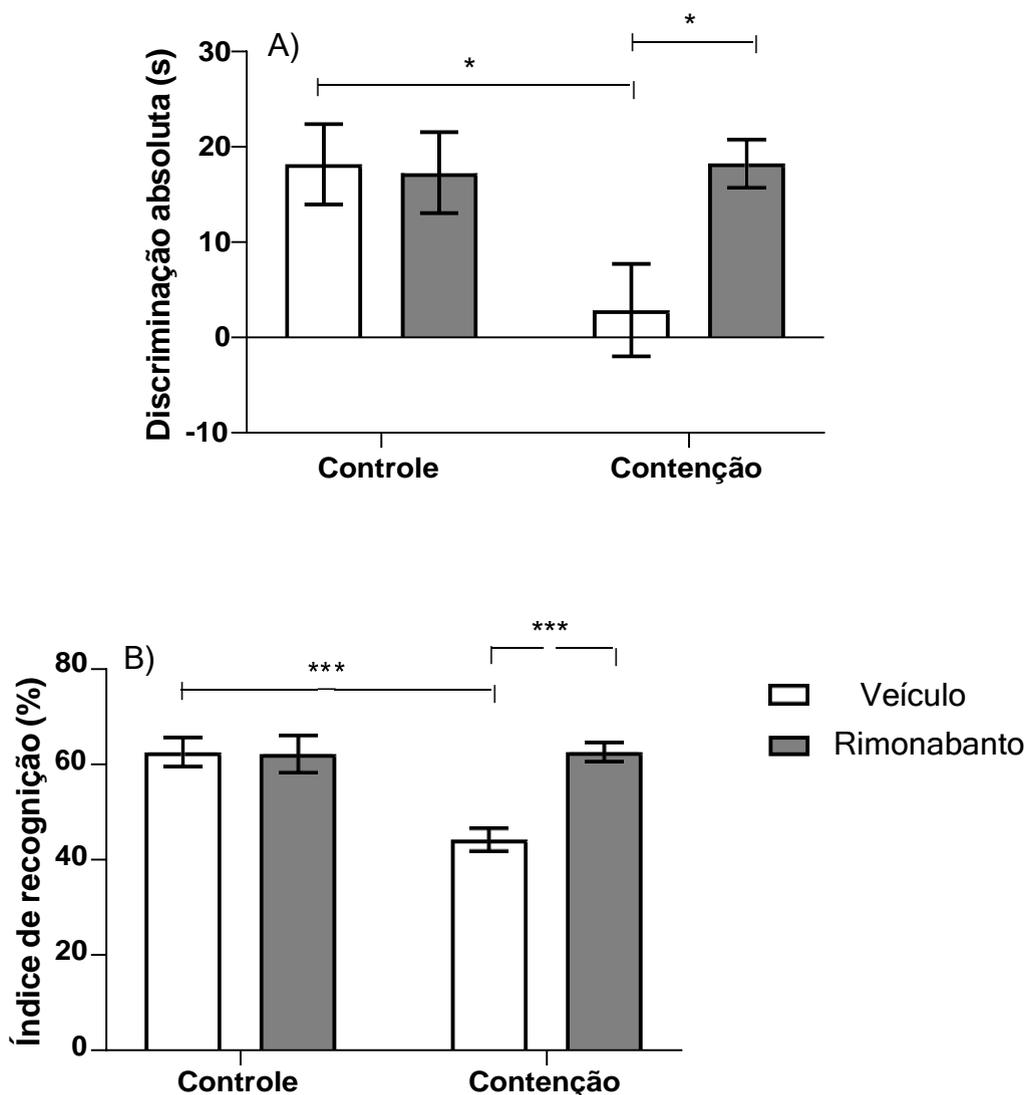


Fonte: da autora.

6.3 EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE O ÍNDICE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Na Figura 5A, podemos observar que o estresse de contenção reduziu significativamente a discriminação absoluta de objetos do grupo veículo [F (1, 24) = 4,01, $p < 0,05$]. O grupo contenção tratado com Rimonabanto apresentou valores semelhantes de discriminação dos animais sem estresse [F (1, 24) = 4,13, $p < 0,05$]. Na Figura 5B, também podemos observar uma redução do índice de reconhecimento dos animais submetidos ao estresse de contenção e tratados com veículo [F (1, 22) = 10,81, $p < 0,001$]. Assim como ocorreu com o grupo contenção tratado com Rimonabanto, podemos observar índices semelhantes ao grupo sem estresse tratado com veículo [F (1, 22) = 10,89, $p < 0,001$].

Figura 5 - Efeitos do estresse de contenção e do tratamento com Rimonabanto (3 mg/kg, i.p.) sobre a discriminação absoluta de objetos (A) e sobre o índice de reconhecimento (B). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey * $p < 0,01$ versus grupo veículo + controle ou grupo veículo + contenção; *** $p < 0,001$ versus grupo veículo + controle ou grupo veículo + contenção.

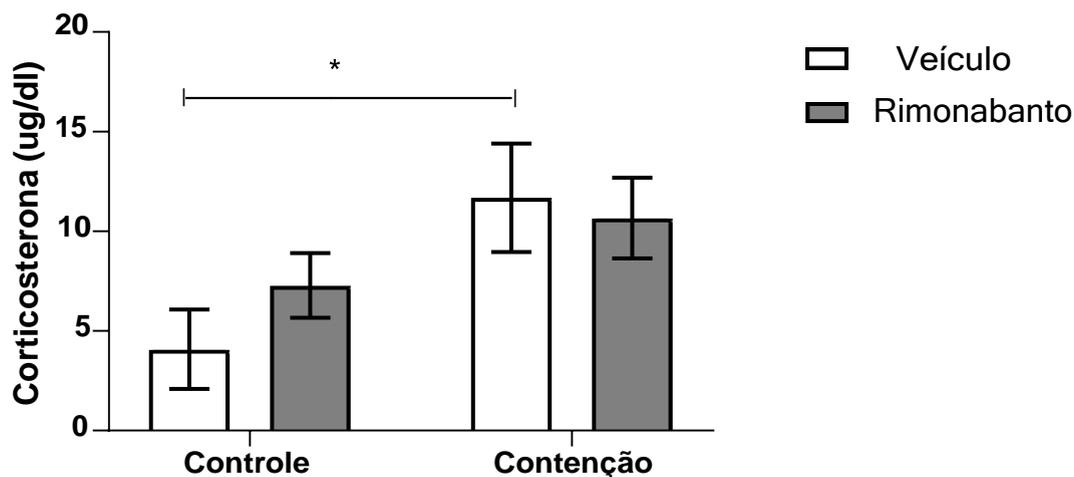


Fonte: da autora.

6.4 EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE CORTICOSTERONA

Na Figura 6, apresentada a seguir, podemos observar que o estresse de contenção aumentou significativamente a concentração plasmática de corticosterona nos animais tratados com veículo [$F(1, 22) = 6,30, p < 0,05$]. O tratamento com Rimonabanto, por si só, não apresentou efeito significativo entre os grupos estudados, porém eliminou a diferença estatística existente nos níveis plasmáticos de corticosterona entre os grupos controle e submetido à contenção.

Figura 6 - Efeitos do estresse de contenção e do tratamento com Rimonabanto (3 mg/kg, i.p.) sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona. Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ versus grupo veículo + controle

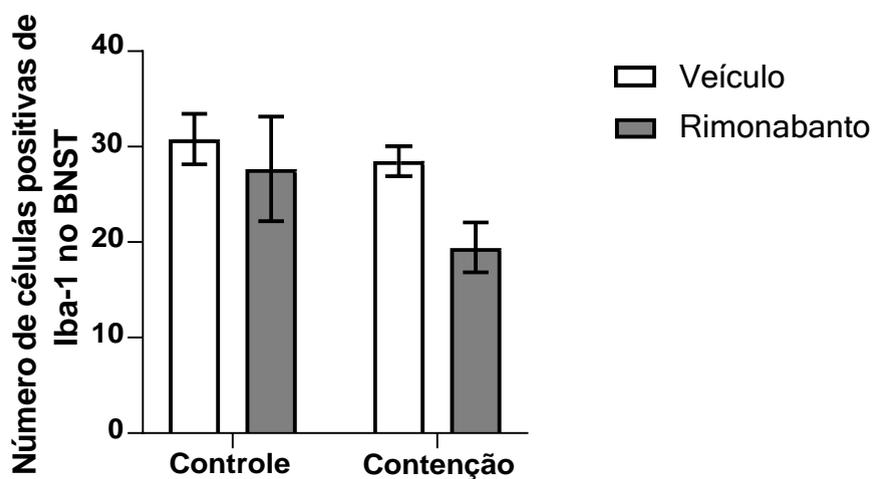


Fonte: da autora.

6.5 EFEITOS DO ESTRESSE DE CONTENÇÃO SOBRE A IMUNORREATIVIDADE A IBA-1 NO SNC

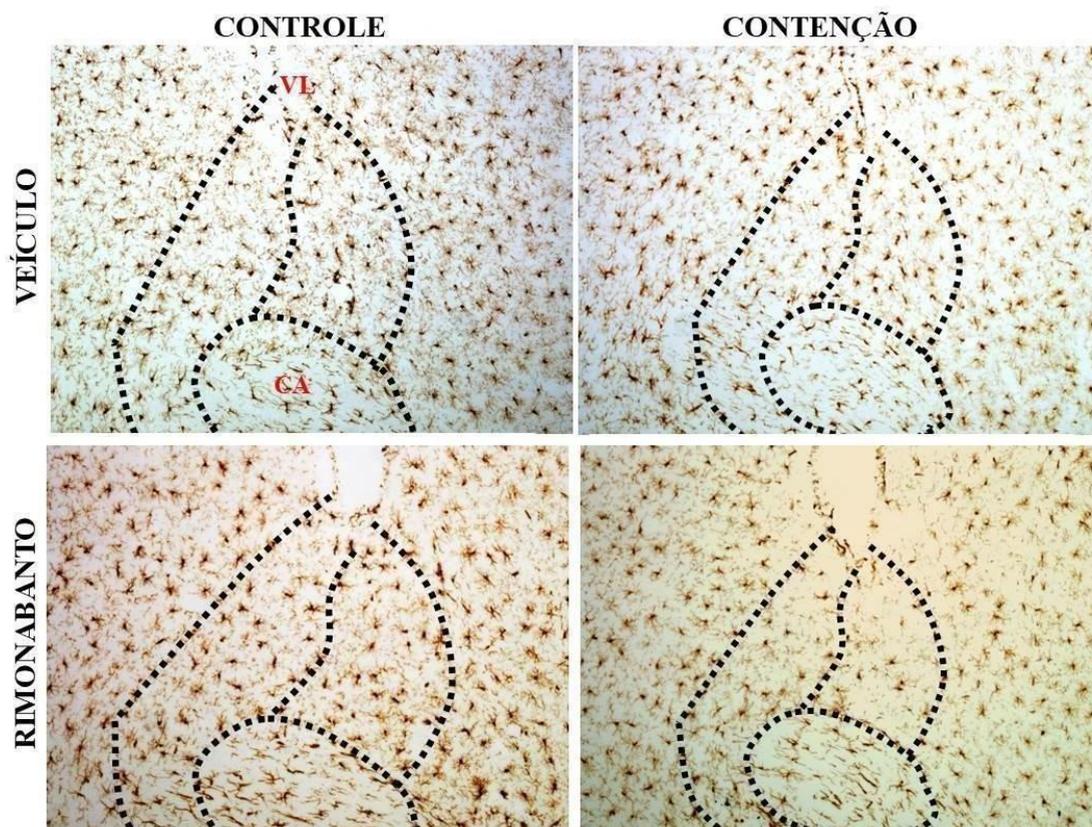
A Figura 7, apresentada a seguir, mostra o número de células imunorreativas a Iba-1 no BNST. De acordo com os dados, nem o estresse de contenção, tampouco o tratamento com Rimonabanto, foram capazes de alterar significativamente este parâmetro. As fotos representativas das diferentes condições experimentais encontram-se apresentadas na Figura 8.

Figura 7 - Efeitos do estresse de contenção e do tratamento com Rimonabanto (3 mg/kg, i.p.) sobre o número de células imunorreativas a Iba-1 no *Bed Nucleus of Stria Terminalis* (BNST). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey.



Fonte: da autora.

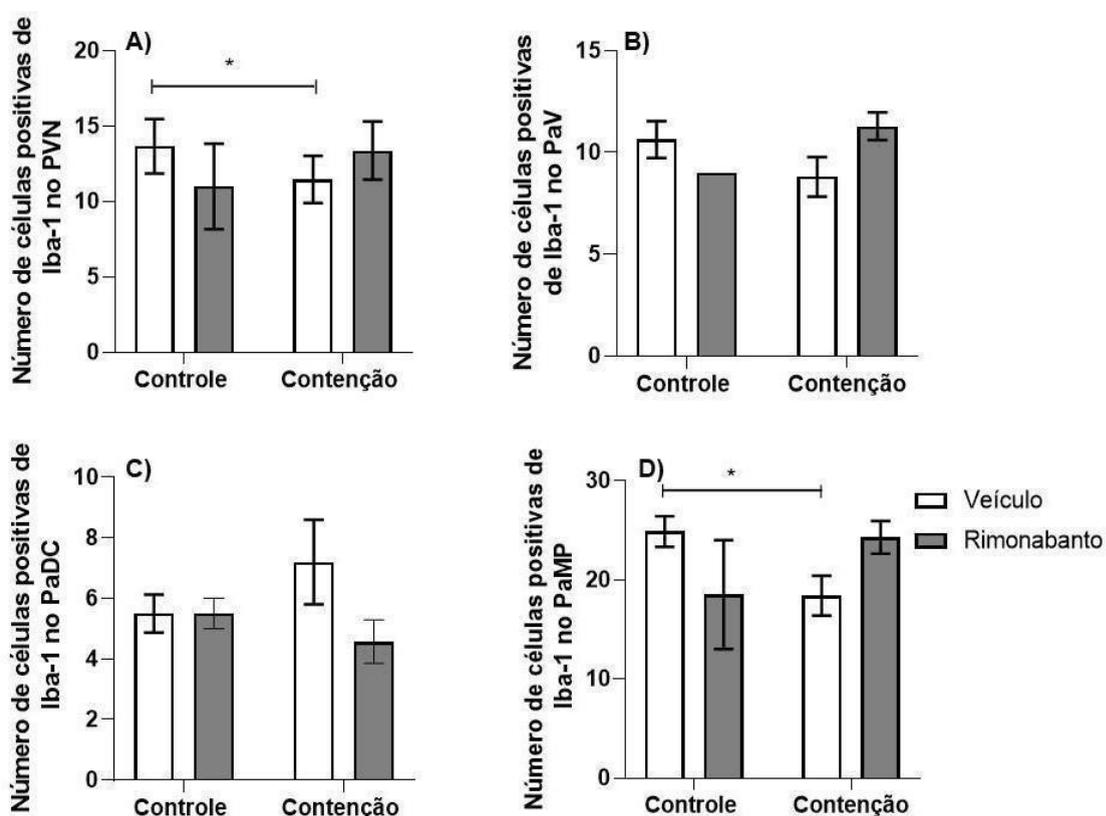
Figura 8 - Fotomicrografias representativas da imunorreatividade a Iba-1 no *Bed Nucleus of Stria Terminalis* (BNST) de animais tratados com veículo ou rimonabanto (3 mg/Kg). As imagens foram obtidas com ampliação de 20X. VL: ventrículo lateral; CA: comissura anterior.



Fonte: da autora.

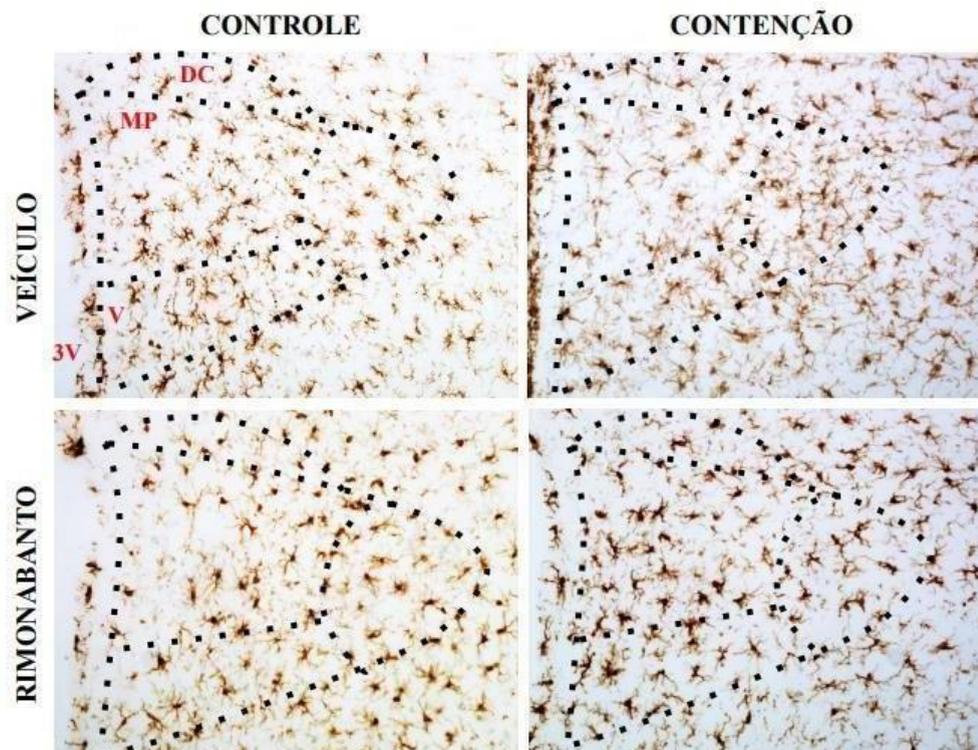
De acordo com a Figura 9, o estresse de contenção reduziu significativamente o número de células microgliais no PVN [$F(1, 18) = 7,52$, $p < 0,05$], sendo este efeito significativo apenas na região parvocelular medial [PaMP, Figura 8D; $p < 0,05$]. Fotomicrografias representativas de cada grupo experimental são mostradas na Figura 9.

Figura 9 - Efeitos do estresse de contenção e do tratamento com Rimonabanto (3 mg/kg, i.p.) sobre o número de células imunorreativas a Iba-1 no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN total, A), e nas subdivisões parvocelular ventral (B), dorsal cap (C) e parvocelular medial (D). Resultados expressos em média \pm EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ versus grupo veículo + controle.



Fonte: da autora.

Figura 10 - Fotomicrografias representativas da imunorreatividade a Iba-1 no núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) de animais tratados com veículo ou rimonabanto (3 mg/Kg). 3V: terceiro ventrículo; V: região parvocelular ventral; MP: região parvocelular medial; DC: região parvocelular dorsal cap.
As imagens foram obtidas com ampliação de 20X.



. Fonte: Da autora.

7 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstram que o modelo de estresse de contenção por 60 minutos diários durante 7 dias foi eficaz em induzir aumento da secreção de corticosterona e aumento do índice adrenal, em paralelo a uma redução da massa do timo, bem como em produzir sintomas de anedonia e déficit de memória. Por outro lado, o peso corporal e da massa da hipófise não foram alterados, indicando que o modelo pode ser considerado um estressor leve.

A hipofagia, com seu consequente reflexo de redução do peso corporal, pode ser característica de modelos de estresse mais severos, sendo considerada um sintoma do tipo ansioso (Jiang & Eiden, 2016). Isso porque os glicocorticoides e a noradrenalina/adrenalina, liberados em resposta ao estresse, são importantes hormônios catabólicos, que degradam as reservas corporais de substratos, de forma a disponibilizar glicose (Guyton e Hall, 2017). Além do mais, há evidências de que o aumento da liberação de CRH pelo hipotálamo tenha um efeito anorexígeno central (Uchoa *et al*, 2010). Em conjunto, essas respostas determinariam diminuição da ingestão alimentar e, consequentemente, do ganho de peso corporal, sendo proporcional à intensidade e à duração do estresse. De fato, a duração dos estímulos estressores parece ser fundamental, tal qual demonstrado por Rostamkhani (2012), em cujo estudo ratos foram submetidos ao estresse de choque nas patas com duração de 1, 15 ou 30 dias, apresentando alterações no peso corporal e na massa de tecidos neuroendócrinos somente aqueles animais submetidos ao protocolo de tempo maior.

A hipertrofia adrenal, presente nos animais submetidos ao estresse de contenção, foi o primeiro indício de ativação do eixo HHA pelo presente protocolo. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Bassett e Cairncross (1975), que realizaram a exposição de ratos machos a choques escapáveis irregulares nas patas por até 71 dias. Os autores demonstraram que a exposição ao estresse foi capaz de promover alterações morfológicas como a hipertrofia da adrenal, associada ao aumento da zona fasciculada (relacionada à produção dos glicocorticoides) e da zona reticular (associada à produção de esteroides sexuais). Similarmente, Langgartner e colaboradores (2018)

demonstraram que ratos submetidos a alojamento de colônia subordinada por 19 dias apresentaram aumento da massa da adrenal em relação ao grupo não exposto ao protocolo. O mesmo efeito também foi observado em um estudo realizado em 2015 por Naryzhnaya e colaboradores, que induziram o estresse por meio de imobilização por 24 horas ou imobilização associada à hipóxia, neste estudo, além do aumento da massa da adrenal, foi observada involução do timo e baço, e uma elevação de 67% da corticosterona sérica nestes animais.

Em nosso estudo, avaliamos também o timo, que apresentou uma redução de sua massa, quando comparado o grupo contenção ao grupo controle. Esses dados foram corroborados não somente pelo estudo já citado acima (Naryzhnaya *et al*, 2015), mas também por Pertsov e colaboradores (2015), que demonstraram que ratos submetidos a 4 horas de estresse de contenção diariamente por 1, 3 ou 8 dias apresentaram involução do timo e hipertrofia da adrenal. A redução do timo também foi constatada em um trabalho em que camundongos foram expostos ao modelo de estresse social por 1 e 8 dias (Stankiewicz *et al*, 2014), e em resposta a um modelo de estresse emocional (Pertsov *et al*, 2011), demonstrando que a avaliação dos índices adrenal e do timo constitui um indicador seguro da ocorrência de estresse, uma vez que se correlacionam diretamente com a secreção de cortisol/corticosterona e com o efeito deste hormônio sobre a função imune, que será discutida adiante neste texto.

Os resultados acerca da hipertrofia adrenal dos animais submetidos ao estresse de contenção foram corroborados pela análise da concentração de corticosterona plasmática, que apresentou elevação no grupo estressado, efeito que foi abolido no grupo tratado com Rimonabanto. Efeitos semelhantes foram encontrados em um estudo realizado por Shoji e colaboradores (2019), em que ratos submetidos a dois protocolos diferentes de estresse de contenção por 6 horas diárias durante 10 ou 21 dias apresentaram aumento dos níveis de corticosterona plasmática. Em relação à participação do receptor CB1 nestas respostas, estudos realizados por Mark e colaboradores (2006) demonstraram que a administração endovenosa de Rimonabanto na dose de 1 mg/kg aumentou 6 vezes a secreção de corticosterona, contrariando os presentes achados. No entanto, os autores argumentam que o bloqueio farmacológico dos

receptores CB1 apresenta um efeito dose- e tempo-dependente, o que poderia justificar resultados diferentes (Urigüen et al, 2004).

Por meio do teste de preferência a sacarose, demonstramos o desenvolvimento de anedonia nos animais submetidos ao estresse de contenção. Resultados semelhantes em roedores foram observados Chiba e colaboradores (2012), que submeteram camundongos a um protocolo de estresse crônico de contenção e os mesmos apresentaram uma redução na preferência pelo consumo de sacarose, comparados àqueles que não sofreram o estresse.

A anedonia é caracterizada pela perda de interesse em situações antes prazerosas, sendo fruto da disfunção ou frustração de algum componente do sistema de recompensa (Spitzer e Williams, 1980 apud Lin *et al.* 2022). De acordo com Rizvi e colaboradores (2016), o sistema de recompensa é composto pelo interesse, motivação e esforço. Se o interesse desencadear uma motivação suficientemente forte, de modo a tornar a recompensa esperada subjetivamente maior que o esforço demandado, há a construção de um plano de ação que, ao ter o objetivo alcançado, gera uma resposta hedônica, que seria o processamento e desfrute da recompensa. Toda essa cascata é coordenada por retroalimentação, atualizando esse sistema e influenciando futuros processos relacionados à recompensa (Hoflich et al, 2019).

A anedonia é, de acordo com o DSM-5, um dos critérios maiores para diagnóstico do transtorno depressivo maior (Apa, 2013). Logo, pode-se concluir que a exposição ao estresse pode aumentar a susceptibilidade ao desenvolvimento de sintomas depressivos, entre eles, a anedonia, o comportamento evitativo e a redução da memória e atenção. Estudos baseados em ressonância magnética funcional de pacientes com transtorno depressivo maior têm demonstrado alterações significativas na ativação de estruturas relacionadas à recompensa, com redução da ativação de áreas subcorticais e límbicas e aumento da ativação de regiões corticais. Pacientes deprimidos mostram uma alteração na correlação inversa entre expectativa de recompensa e reatividade, associada à gravidade da anedonia (Hoflich *et al.*, 2019).

A participação dos receptores CB1 no comportamento depressivo associado ao estresse ainda permanece controversa na literatura. Em nosso

estudo, ficou claro que o tratamento com o antagonista CB1 reverteu os efeitos do estresse sobre o desenvolvimento de anedonia, ou seja, apresentou um efeito antidepressivo, demonstrando, portanto, que a via endógena mediada pelo receptor CB1 possui um efeito facilitador no desenvolvimento de depressão e ansiedade.

Shearman e colaboradores (2003) observaram que camundongos machos com sintomas tipo depressivos que receberam o antagonista de receptor CB1 AM251 (3-30 mg/kg) apresentaram redução significativa no tempo de imobilidade no teste de nado forçado, sugerindo que o antagonista CB1 produza efeitos antidepressivos, efeitos estes comparáveis aos da desipramina, classicamente utilizada como antidepressivo. Da mesma forma, Ostadhadi e colaboradores (2016), utilizando modelo de sintomas tipo-depressivos induzidos por choque, observaram que camundongos tratados com AM251 também apresentaram tempo de imobilidade significativamente reduzido quando comparados ao grupo não tratado, sugerindo, mais uma vez, a participação da via endógena mediada pelo CB1 na geração da depressão.

Em nosso estudo, também observamos que os animais que passaram pelo estresse de contenção durante 7 dias apresentaram uma redução no índice de RO. Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Li e colaboradores (2012), que avaliaram o efeito do estresse de contenção agudo de uma hora em diferentes componentes da memória dos animais. Esses autores demonstraram que o estresse induziu prejuízo na consolidação de memórias e RO em curto e longo prazo.

Nava-Mesa (2013) também realizou ensaios para verificar os efeitos do estresse de agudo sobre a memória de ratos. Para isso, os animais foram treinados em uma tarefa para reconhecer objetos e, logo após o fim do treinamento, foram submetidos ao estresse de contenção por 4 horas e 30 minutos, enquanto o grupo controle permaneceu sem manipulação. Após o tempo de contenção, os animais foram submetidos ao teste: o grupo não estressado alcançando resultados satisfatórios, enquanto o grupo estressado apresentou um resultado ruim na tarefa proposta.

Prejuízos na memória de camundongos submetidos ao estresse crônico também foram observados por Philbert e seus colaboradores (2015), que

submeteram os animais ao estresse durante 8 semanas e testaram sua memória no labirinto aquático de Morris. Após os resultados, os autores concluíram que o estresse crônico comprometeu a aprendizagem e a memória dos animais.

Mais uma vez, em nosso estudo, o tratamento com o antagonista CB1 Rimonabanto reverteu os efeitos do estresse sobre o acesso à memória, ou seja, apresentou um efeito protetor, indicando que a via endógena mediada pelos ECBs participa da perda cognitiva neste modelo. Nossos resultados corroboram aqueles obtidos por Takahashi e colaboradores (2005), utilizando a exposição repetida de ratos em um modelo de labirinto em T elevado associado ao uso de escopolamina, que induz prejuízo de memória. Neste estudo, a administração de Rimonabanto (SR141716A) induziu reversão dos déficits de memória produzidos pela escopolamina, sugerindo que o bloqueio dos receptores CB1 poderia otimizar a formação de novas sinapses em áreas cerebrais relacionadas a esta função cognitiva.

Os mesmos resultados também foram obtidos com o uso de outros antagonistas CB1. A administração de AM251 por 7 dias em animais submetidos a estresse leve imprevisível combinado com terapia de choque eletroconvulsiva para levou à atenuação do prejuízo no desempenho de memória no teste de labirinto aquático de Morris, evidenciando efeito positivo do receptor CB1 no aprendizado e na função de memória. Em conjunto, esses dados sugerem que o receptor CB1 pode ser um alvo terapêutico com grande potencial para prevenir o comprometimento cognitivo (Yu Jian *et al*, 2021). Esse efeito também foi reproduzido no modelo de camundongos *Knockout* para receptores CB1, os quais obtiveram um índice superior a 50% no índice de RO, quando comparados aos animais *wild type*, mais uma vez indicando que os receptores CB1 participam do processo de consolidação da memória (Reibaud *et al*, 1999).

Além de prejudicar diversos eventos que culminam com a consolidação da memória, o estresse tem um efeito claro sobre a resposta imune, tanto em nível periférico, como central. Neste texto, já evidenciamos, por meio da redução da massa do timo, um efeito periférico do estresse de contenção.

Como sabemos, o timo é um órgão linfóide associado à maturação de linfócitos, sendo o primeiro a aparecer no desenvolvimento, acomodando material imunológico importante relacionado a respostas imunes específicas e

inespecíficas (Fu *et al*, 2022). De acordo com a teoria de interação imune-endócrina, produtos secretados por células T ativadas podem aumentar o cortisol plasmático e afetar a taxa de renovação de catecolaminas hipotalâmicas, estabelecendo uma ligação direta e aferente entre as respostas imunes periférica e central (Xu *et al*, 2017). Outra evidência que sugere essa interação bidirecional é o efeito de diversos estímulos ambientais sobre o sistema imunológico, uma vez que situações agudas de estresse, por meio da liberação de ACTH, endorfina e cortisol, alteram o funcionamento das células imunes, afetando, portanto, toda a resposta imunológica (Westly *et al*, 1984).

Também já foi demonstrado que, em diversas espécies, o cortisol pode causar lise de timócitos corticais imaturos, resultando no enriquecimento dos mais maduros. Em contrapartida à involução tímica causada por altas doses de glicocorticóides, a adrenalectomia produz hipertrofia do timo e dos linfonodos, demonstrando assim, que há influência dos níveis de glicocorticóides sobre a atividade de órgãos linfoides (Van Oers *et al*, 2020).

Além disso, o estresse também afeta a função imune no SNC. Neste cenário, temos como protagonistas as células da microglia. Conforme amplamente explorado nos últimos anos, a microglia não só desempenha um papel crítico na homeostase sináptica, mas também desencadeia inflamação cerebral, que está subjacente à maioria das consequências fisiopatológicas do SNC de doenças infecciosas e neurodegenerativas (Infantes-López *et al*, 2023). Isso porque a microglia está amplamente distribuída no SNC e são as principais células do sistema imunológico inato, respondendo primeiramente a eventos patológicos. Estas células participam de três funções essenciais: 1) detectar mudanças em seu micro-ambiente, por meio de seus sensores; 2) manutenção fisiológica, havendo migração para locais lesionados e remodelamento de sinapses, com manutenção da mielina; 3) proteção contra estímulos prejudiciais, incluindo expressão de padrões moleculares associados a patógenos (Rauf *et al*, 2022).

Em resposta a esses estímulos, a microglia irá produzir citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral, interleucinas e quimiocinas para recrutar células e remover agentes patológicos. Entretanto, embora a neuroinflamação seja um mecanismo neuroprotetor, este processo pode induzir a uma

neurotoxicidade que está relacionada à neurodegeneração. Além disso, foi demonstrado que, em resposta ao envelhecimento e à exposição ao estresse crônico, as células da microglia podem apresentar uma morfologia distrófica e resposta inflamatória exacerbada, intensificando estas respostas (Kwon *et al*, 2020).

Em nosso estudo, avaliamos a imunorreatividade a Iba-1, um marcador de microglia, no BNST e no PVN, que são duas estruturas sabidamente envolvidas na geração de comportamentos e no controle da função neuroendócrina associada à ativação do eixo HHA. Observamos que o estresse de contenção, apesar de não alterar o número de células da microglia no BNST, reduziu significativamente a imunomarcagem para Iba-1 na região parvocelular medial do PVN. Estudos semelhantes realizados por Tynan e colaboradores (2010) em animais submetidos a estresse de contenção (2 sessões diárias com duração de 30 minutos por 1, 7 ou 14 dias) demonstraram uma redução da imunorreatividade a Iba-1 no BNST, hipocampo e hipotálamo, corroborando parcialmente os presentes achados. Em resposta ao estresse social por derrota, o mesmo resultado foi encontrado (Zhang *et al*, 2019).

Em diversos ensaios clínicos, foram encontrados em ativação microglial na ínsula, no córtex cingulado anterior e no córtex pré-frontal em pacientes com transtornos psiquiátricos, depressão e naqueles com ideação suicida. Estes resultados sugerem que o grau de ativação microglial está positivamente relacionado com a gravidade dos transtornos psiquiátricos (Fang *et al*, 2023).

Em roedores, o estresse crônico, incluindo o estresse crônico de derrota social, o estresse leve imprevisível crônico e o estresse crônico de restrição, frequentemente utilizados para induzir distúrbios relacionados ao estresse, resulta em citocinas periféricas elevadas e na ativação da microglia em situações de estresse regiões cerebrais sensíveis, como o hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala (Hayley *et al*, 2021.; Rosenblat *et al*, 2018).

Da mesma forma, em estudo anterior descobriu que a inflamação induzida por lipopolissacarídeo, uma via clássica de ativação da microglia que atua através da via de sinalização de ligação ao gene TLR4/fator nuclear- κ , aumentou o risco de depressão em camundongos, o que poderia ser melhorado pela depleção microglial de PLX5622 ou minociclina. Indicando mais uma vez que a

ativação microglial está fortemente ligada ao desenvolvimento de depressão e transtornos psiquiátricos (Witcher *et al*, 2021).

Walker e colaboradores (2013), observaram em ratos machos que o estresse crônico foi capaz de produzir uma variedade de alterações na ativação microglial e na expressão de fatores imunológicos, por exemplo, o estresse de restrição crônico aumentou a densidade das células microgлияis e aumentou a ativação microglial, conforme refletido na morfologia e expressão de moléculas imunes, implicando diretamente em déficits na memória de trabalho espacial. Esses resultados reforçam a hipótese de interação direta entre o sistema imune e o sistema endócrino, subsidiando os efeitos bidirecionais em resposta ao estresse.

Conforme amplamente explorado nos últimos anos, a microglia não apenas desempenha um papel crítico na homeostase sináptica, mas também desencadeia a inflamação cerebral, que está subjacente à maioria das consequências fisiopatológicas do SNC de doenças infecciosas e neurodegenerativas. Assim, no SNC, foi encontrado um número reduzido de células microgлияis no PVN parvocelular de animais estressados, que é o principal local para a regulação neuroendócrina do eixo HPA. Uma vez que o antagonismo do CB1 pode deslocar a ligação dos ECBs para outros subtipos de receptores, como discutido anteriormente, os presentes resultados são incapazes de estabelecer a contribuição relativa da sinalização microglial mediada pelo CB2 para a integridade das respostas comportamentais e neuroendócrinas.

8 CONCLUSÃO

Em conclusão, o estresse de contenção leve por 1h/dia durante 7 dias ativou o eixo HHA e induziu sintomas do tipo depressivo (anedonia), bem como induziu recuperação prejudicada da memória. A restrição também aparentemente reduziu a função imunológica tanto periféricamente quanto centralmente, como evidenciado pela redução do tamanho do timo e pela reduzida imunorreatividade a Iba-1 no PaMP. Embora a participação dos receptores CB1 em condições depressivas e na retenção de memória permaneça controversa, os presentes resultados apoiam um potencial benéfico para o rimonabanto e outros antagonistas do CB1 no gerenciamento da função cognitiva. Por outro lado, a participação do receptor CB1 nas respostas imunes ainda é controversa, uma vez que parece variar significativamente em resposta ao modelo, no que tange à duração e à intensidade do estímulo.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-V). Arlington, VA: **American Psychiatric Association**. 2013.

ANDRIES, Kalsbeek.; RUUD, M.; BUIJS. Organization of the neuroendocrine and autonomic hypothalamic paraventricular nucleus. **Handbook of Clinical Neurology**. Mexico. v.180. p.45-63. 2021.

ARAKI.T.; IKEGAYA, Y. KOYAMA R. The effects of microglia- and astrocyte-derived factors on neurogenesis in health and disease. **Eur J Neurosci**. Japan. 2021 v. 54. p. 5880-5901.2021

BASSETT, JR.; CAIRNCROSS, Kd.; Morphological changes induced in rats following prolonged exposure to stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. Australia. v.3. p.411-420. 1975.

BENARROCH, Ee. Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. **Clin Auton Res**. Rochester. v.15. p. 254-63. 2005.

BOTA, M.; SPORNS, O.; SWANSON, LW. Neuroinformatics analysis of molecular expression patterns and neuron populations in gray matter regions: the rat BST as a rich exemplar. **Brain Res**. California. p. 174-193. 2012

BRIGHT, U; AKIRAV, I. Modulation of Endocannabinoid System Components in Depression: Pre-Clinical and Clinical Evidence. **Int J Mol Sci**. Haifa. p. 15-23.2022.

BUYNITSKY, T.; MOSTOFSKY, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. Boston. v. 33. p. 1089- 1098, 2009.

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**. Japan. v. 39. p. 112-119, 2012.

COPE, EC.; GOULD, E. Adult Neurogenesis, Glia, and the Extracellular Matrix. **Cell Stem Cell**. Princeton. v. 24. p. 690-705. 2019.

CSÁKI, Á.; KOCSIS, K.; HALÁSZ, B.; KISS, J. Localization of glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus studied by retrograde transport of [3H]d-aspartate autoradiography. **Neuroscience**. Japan. v.101. p. 637-655. 2000.

DABROWSKA, J.; HAZRA, R.; GUO, J-D.; DEWITT, S.; RAINNIE, DG. Central CRF neurons are not created equal: phenotypic differences in CRF-containing

neurons of the rat paraventricular hypothalamus and the bed nucleus of the stria terminalis. **Front Neurosci.** Atlanta. v. 7. 2013.

DAVIU, N.; FÜZESI, T.; ROSENEGGER, Dg.; RASIAH, Np.; STERLEY, TL.; PERINGOD, G.; BAINS, Js. Paraventricular nucleus CRH neurons encode stress controllability and regulate defensive behavior selection. **Nat Neurosci.** Canada. v.23. p.398-410.2020.

DE SOUSA, M.B.C. SILVA, H.P.A; GALVAO-COELHO, N.L. Stress Response: I. Homeostasis and Allostasis Theory, **Estud. Psicol.**Brazil.v.20. p. 1-10. 2015.

DI MARZO, Rg. J. Gertsch Pertwee. Phytocannabinoids beyond the Cannabis plant – do they exist? **Br J Pharmacol.** Switzerland. v.160. p.523-529. 2010.

DONG, Hw.; SWANSON, Lw. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. **J Comp Neurol.** California. v.468. p.277-298. 2014

ENGELI, S. et al. Influence of Dietary Fat Intake on the Endocannabinoid System in Lean and Obese Subjects. **Obesity.** Germany. v. 22, n. 5, p. 70-76, 2014.

FANG, S.; WU, Z.; GUO, Y.; ZHU, W.; WAN, C.; YUAN, N.; CHEN, J.; HAO, W.; MO, X.; GUO, X.; FAN, L.; LI, X.; CHEN, J. Roles of microglia in adult hippocampal neurogenesis in depression and their therapeutics. **Front Immunol.** China. 10. 2023.

FRODL T, O'KEANE, V. How does the brain deal with cumulative stress? A review with focus on developmental stress, HPA axis function and hippocampal structure in humans. **Neurobiol Dis.** Dublin. v.52.p.24-37.2013.

FUNK, D.; LI, Z.; LÊ, AD. Effects of environmental and pharmacological stressors on c-fos and corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain: relationship to the reinstatement of alcohol seeking. **Neuroscience.**Toronto. v.138. p. 235-243. 2006.

FU.Y.; ZHANG, S.; ZHAO, N.; XING, L.; LI, T.; LIU, X.; BAO, J.; LI, J.Effect of mild intermittent cold stimulation on thymus immune function in broilers. **Poult Sci.** China. v.101. 2022.

FÜZESI, T.; DAVIU, N.; WAMSTEEKER, Cusulin JI.; BONIN, Rp.; BAINS, Js. Hypothalamic CRH neurons orchestrate complex behaviours after stress. **Nat Commun.** Toronto. v.16.2016.

GIBNEY, S. M.; FAGAN, E. M.; WALDRON, A-M.; O 'BYRNE, J.; CONNOR, T. J.; HARKIN, A. Inhibition of stress-induced hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase exhibits antidepressant activity in an animal model of depressive behaviour. **International Journal of Neuropsychopharmacology.** Dublin. v.17. p. 917- 928, 2014.

GODOY-MATOS, A. F. et al. O Sistema Endocanabinóide: Novo Paradigma no Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab.** Rio de Janeiro. v. 50, n. 2, p. 390-399, 2006

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. **Elsevier Editora**, v. 13, p. 1176, 2017.

HAYLEY, S.; HAKIM, Am.; ALBERT, Pr. Depression, dementia and immune dysregulation. **Brain.** Ottawa. v.12. p. 746-760. 2021.

HAO, Y; GE, H; SUN, M; GAO, Y. Selecting an Appropriate Animal Model of Depression. **Int J Mol Sci.** London. v. 28.p.20-39,2019.

HAUENSTEIN, Ej. Depression in adolescence. **J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.** Charlottesville. v.3. 2003.

HOFLICH, A.; MICHENTHALER, P.; KASPER, S.; LANZENBERGER, R. Circuit Mechanisms of Reward, Anhedonia and Depression. **International Journal of Neuropsychopharmacology.** Austria.v. 22. p. 105-118. 2019.

INFANTES-LÓPEZ, MI.; NIETO-QUERO, A.CHAVES-PEÑA, P.; ZAMBRANA-INFANTES, E.; CIFUENTES, M.; MÁRQUEZ, J.; PEDRAZA, C.; PÉREZ-MARTÍN, M. New insights into hypothalamic neurogenesis disruption after acute and intense stress: implications for microglia and inflammation. **Front Neurosci.** Spain.v. 17.2023.

JALABERT, M.; ASTON-JONES, G.; HERZOG, E.; MANZONI, O.; GEORGES, F. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the control of ventral tegmental area dopamine neurons. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** France. v.33: p.1336-1346. 2009.

JENNINGS, Jh.; SPARTA, Dr.; STAMATAKIS, Am.; UNG, Ri.; PLEIL, Ke.; KASH, Tl. Distinct extended amygdala circuits for divergent motivational states. **Nature.** North Carolina.v.496. p. 224-228.2013.

JIANG Sz, EIDEN Le. Activation of the HPA axis and depression of feeding behavior induced by restraint stress are separately regulated by PACAPergic neurotransmission in the mouse. **Stress.** Bethesda. v. 19, p. 374-382, 2016.

JONES, C. A., WATSON, D. J. & FONE, K. C. Animal models of schizophrenia. **Br J Pharmacol.** Nottingham. v. 164, p. 1162-1194, 2011.

KALIN, Nh.; SHELTON, Se.; FOX, As.; OAKES, Tr.; DAVIDSON, Rj. Brain regions associated with the expression and contextual regulation of anxiety in primates. **Biol Psychiatry.** Madinson. v.58. p. 796-804. 2015

KAMPRATH, K. MARSICANO, G. TANG, J. MONORY, K. BISOGNO, T. DI MARZO, V. LUTZ, B. WOTJAK, Ct. Cannabinoid CB1 receptor mediates fear extinction via habituation-like processes. **J Neurosci.** Munich. v. 26. p. 6677-6686. 2006.

KANDEL, E. R. *et al.* Tradução: SEVERO A. L. Princípios de Neurociências. **Artmed Editora**. Brazil. p. 1496, 2014.

KANT, GJ; EGGLESTON, T. LANDMAN-ROBERTS, L. KENION, Cc; DRIVER, Gc. MEYERHOFF, JL. Habituation to repeated stress is stressor specific. **Pharmacol Biochem Behav**. China. v. 22. P. 631-634.1985.

KENDLER, K, S; KARKOWSKI, L.M; PRESCOTT, C.A. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression, *Am. J. Psychiatry*. Richmond. v.156. p.837-841.1999.

KRISHNAN, V; NESTLER, Ej. The molecular neurobiology of depression. **Nature**. Texas. v.16. p. 894-902. 2008.

KWON, Hs.; KOH, Sh. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. **Transl Neurodegener**. Korea. v.26. 2020.

LANGGARTNER, D.; FÜCHSL, Am.; KAISER, Lm.; MEIER, T.; FOERTSCH, S.; BUSKE, C.; REBER, So.; MULAW, Ma.; Biomarkers for classification and class prediction of stress in a murine model of chronic subordination stress. **PLoS One**.Germany. v. 5. p.13-19. 2018.

LARRIVA-SAHAD, J. Histological and cytological study of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat. II. Oval nucleus: extrinsic inputs, cell types, neuropil, and neuronal modules. **J Comp Neurol**. Mexico. v.497. p. 772-807. 2006.

LEE, D.Y; KIM, E; CHOI, M.H. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. **BMB Rep**. Korea. v.148. p. 209-216. 2015

LEE, H.; NOH, J. Social exclusion intensifies anxiety-like behavior in adolescent rats. **Behavioural Brain Research**. Korea. v.284. p.112-117. 2015.

LIN, J.; SU, Y.; RIVZI, S.; JAGODA, J.; LI, J.; WU, Y., DAI, Y.; ZHANG, Y.; KENNEDY, S.; SI, T. Define and characterize the anhedonia in major depressive disorder: An explorative study. **Journal of Affective Disorders**. China. 13. P.235-242. 2022

LOGAN, Jg. BARKSDALE, Dj. Allostasis and allostatic load: expanding the discourse on stress and cardiovascular disease. **J Clin Nurs**. North Carolina. v.17. p.201-208. 2008

LOWE, H; TOYANG, N; STEELE, B; BRYANT, J; NGWA, W. The Endocannabinoid System: A Potential Target for the Treatment of Various Diseases. **Int J Mol Sci**. Baltimore.v. 31.p.22-39.2021.

LU, Hc; MACKIE, K. Review of the Endocannabinoid System. **Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging**. Indiana.v.6. p. 607-615.2021.

MAKINO, S.; GOLD, Pw.; SCHULKIN, J. Effects of corticosterone on CRH mRNA and content in the bed nucleus of the stria terminalis; comparison with the effects in the central nucleus of the amygdala and the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Brain Res.** Bethesda. v.657. p.141-149. 1994.

MALCHER-LOPES, S.; DI, R. HALMOS, K.C; TASKER, J.G., Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism, **J. Neurosci.** Bethesda. v.23.2003.

MARC-ANTOINE, Crocq. History of cannabis and the endocannabinoid system. **Dialogues in Clinical Neuroscience.** France. v. 22.p. 223-228.2020.

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, A. F.; SILVEIRA, R. D. O. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul.** Brasil. v. 25. p. 65-74. 2003.

NARYZHAYAYA, Nv.; MASLOV, Ln.; VYCHUZHANOVA, EA.; SEMENTSOV, AS.; PODOKSYONOV, Yk.; PORTNICHENKO, Ag.; LISHMANOV, Yb.; Effect of Hypoxic Preconditioning on Stress Reaction in Rats. **Bull Exp Biol Med.** Siberian. v.159. p. 450-452. 2015.

NAVA-MESA, Mo; LAMPREA, MR; MÚNERA, A. Divergent short- and long-term effects of acute stress in object recognition memory are mediated by endogenous opioid system activation. **Neurobiol Learn Mem.** Bogotá.v. 106. p.185-192.2013.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE). BRASIL, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/eportuguese/publications/pt/>. Acesso em 05 jul.2022

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE). BRASIL, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/eportuguese/publications/pt/>. Acesso em 25 abr. 2022.

OSTADHADI, S; HAJ-MIRZAIAN, A; NIKOUI, V; KORDJAZY, N; DEHPOUR, AR. Involvement of opioid system in antidepressant-like effect of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM-251 after physical stress in mice. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** Iran.v.43.p. 203-215.2016.

ORSO, R; WEARICK-SILVA, Le; CREUTZBERG, Kc. et al. Maternal behavior of the mouse dam toward pups: implications for maternal separation model of early life stress. **Stress.** Brazil. v.21. p.19-27. 2018.

PATEL, S. ROELKE, Ct. RADEMACHER, DJ. HILLARD, Cj. Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signaling. **Eur J Neurosci.** Wisconsin. v.21. p. 1057-1069.2005.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 7th ed.: **Elsevier.** Amsterdam. 2013.

PAWLYK, Ac. A rodent model of sleep disturbances in posttraumatic stress disorder: the role of context after fear conditioning. **Biol Psychiatry**. Pennsylvania. v.27. p. 268-277. 2005.

PERTSOV, Ss.; KOPLIK, Ev.; KALINICHENKO, Ls. Comparative analysis of the effect of cytokines on the thymus, adrenal glands, and spleen in rats with various behavioral characteristics. **Bull Exp Biol Med**. Moscow. v.150. p.277-280.2011.

PERTSOV, Ss.; GRIGORCHUK, Os.; KOPLIK, Ev.; ABRAMOVA, Ay.; CHEKMAREVA, Ny.; CHEKHLOV, Vv.; State of Stress-Marker Organs in Rats with Various Behavioral Characteristics during Repeated Stress Exposures. **Bull Exp Biol Med**. Moscow.v.160. p. 20-23. 2015.

PHILBERT J, BELZUNG C, GRIEBEL G. Long-lasting memory abnormalities following exposure to the mouse defense test battery: An animal model of PTSD. **Physiol Behav**. Spain. v.146. p. 67-72. 2015

RAMAMOORTHY, S; CIDLOWSKI, J.A., Corticosteroids. Mechanisms of action in health and disease. **Rheum. Dis. Clin. North Am**. USA. v.42 p.15-31.2016.

RAUF, A.; BADONI, H.; ABU-IZNEID, T.; OLATUNDE, RAHMAN MM.; PAINULI, S.; SEMWAL, P.; WILAIRATANA, P.; MUBARAK, MS. Neuroinflammatory Markers: Key Indicators in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. **Molecules**. Pakistan.v.17.2022

REIBAUND, M; OBINU, M; LEDENT, C; PARMENTIER, M. Memory enhancement in cannabinoid CB receptor knock-out mice. **European Journal of Pharmacology**. Bruxelles. p. 379. 1999.

REYNOLDS, R, M. Glucocorticoid excess and the developmental origins of disease: Two decades of testing the hypothesis. **Psychoneuroendocrinology**. United Kingdom.v.38. p. 1-11. 2013.

RIZVI S. J.; PIZZAGALLI, D. A.; SPROULE. B. A.; KENNEDY. S. H. Assessing anhedonia in depression: Potentials and pitfalls. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. Toronto. v. 65. P. 21-35. 2016.

ROSENBLAT. JD.; MCINTYRE, RS. Efficacy and tolerability of minocycline for depression: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. **J Affect Disord**. Toronto. v. 227. P. 219-225. 2018.

ROSTAMKHANI, F; ZARDOOZ, H; ZAHEDIASL, S; FARROKHI, B. Comparison of the effects of acute and chronic psychological stress on metabolic features in rats. **J Zhejiang Univ Sci B**. Irã. v.13. p .904-912. 2012.

SAHUQUE.LL.; KULLBERG, EF.; MCGEEHAN, AJ.; KINDER, JR.; HICKS, MP.; BLANTON, MG.; et al. Anxiogenic and aversive effects of corticotropin-releasing factor (CRF) in the bed nucleus of the stria terminalis in the rat: role of CRF receptor subtypes. **Psychopharmacology**. California.v.186. p.122-132.2006.

SCHIAVONE, S.; SORCE, S.; DUBOIS-DAUPHIN, M.; JAQUET, V.; COLAIANNA, M.; ZOTTI, M.; CUOMO, V.; TRABACE, L.; KRAUSE, K-H. Involvement of NOX2 in the development of behavioral and pathologic alterations in isolated rats. **Biol Psychiatry**. Italy. v.66. p.384-392.2009.

SELYE, H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation, **J. Clin. Endocrinol.** China.v. 6. p.117-230. 1946.

SHEARMAN, LP; ROSKO, KM; FLEISCHER, R.; WANG, J; XU, S; TONG, XS; ROCHA, BA. Antidepressant-like and anorectic effects of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM251 in mice. **Behav Pharmacol.** Rahway. v.14. p.573-582. 2003.

SHI, Y. DEVADA, S. GREENELTCH, KM. YIN, D. ALLAN MUFSON, R. ZHOU, JN. Stressed to death: implication of lymphocyte apoptosis for psychoneuroimmunology. **Brain Behav Immun.** USA. v.17. p. 18-26. 2003.

SHOJI, H; MIYAKAWA, T. Differential effects of stress exposure via two types of restraint apparatuses on behavior and plasma corticosterone level in inbred male BALB/cAJcl mice. **Neuropsychopharmacol Rep.** Japan. v. 40. p. 73-84.2019.

STANKIEWICZ, AM.; GOSCIK, J.; SWIERGIEL, AH.; MAJEWSKA, A.; WIECZOREK, M.; JUSZCZAK, GR.; LISOWSKI, P. Social stress increases expression of hemoglobin genes in mouse prefrontal cortex. **BMC Neurosci.** Poland. v.15. 2014.

TAKAHASHI, RN; PAMPLONA, FA; FERNANDES, MS. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. **Neurosci Lett.** Brazil. v.3.p.270-275. 2005.

TYNAN, RJ.; NAICKER, S.; HINWOOD, M.; NALIVAICO, E.; BULLER, KM.; POW, DV.; DAY, TA.; WALKER, FR. Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. **Brain Behav Immun.** Australia. v. 24. p.1058-1068. 2010.

TURESSON, HK.; RODRIGUEZ-SIERRA, OE.; PARE, D. Intrinsic connections in the anterior part of the bed nucleus of the stria terminalis. **J Neurophysiol.**New Jeersey. v.109: p. 2438-2450. 2013.

UCHOA, ET.; DA SILVA, LE.; DE CASTRO, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, LL. Corticotrophin-releasing factor mediates hypophagia after adrenalectomy, increasing meal-related satiety responses. **Horm Behav.** Brazil. v. 5, p. 714-719, 2010.

URIGÜEN, L.; PÉREZ-RIAL, S.; LEDENT, C.; PALOMO, T.; MANZANARES, J. Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. **Neuropharmacology.** Madrid. v.46. p. 966-973. 2004.

VALE, W.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; RIVIER, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. **Science**. Japan. v.18.1981.

VAN, Oers Nsc.; SU, DM.; CHIDGEY, AP.; DUDAKOV, J. Editorial: New Insights Into Thymic Functions During Stress, Aging, and in Disease Settings. **Front Immunol**. Dallas. v. 22. P.11-59. 2020.

VON BORELL, E.H. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. **J Anim Sci**. USA.v.79. p. 260-267.2001.

WADHWA, P. D, et al. The contribution of maternal stress to preterm birth: issues and considerations. **Clin Perinatol**. Irvine. v.38. p.351-384. 2011.

WADE, MR.; DEGROOT, A.; NOMIKOS, GG. Cannabinoid CB1 receptor antagonism modulates plasma corticosterone in rodents. **Eur J Pharmacol**. Indianápolis. v.3. p. 162-167. 2006.

WALKER, FR.; NILSSON, M.; JONES, K. Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. **Curr Drug Targets**. ~~Acta~~. 14. P. 1262-1276. 2013.

WALTER, A.; MAI, JK.; LANTA, L.; GÖRCS, T. "Distribuição diferencial de marcadores imuno-histoquímicos no núcleo do leito da estria terminal no cérebro humano". **J Chem Neuroanat**. Brasil. v.4. p. 281-298. 1991.

WESTLY, HJ.; KELLEY, KW. Physiologic concentrations of cortisol suppress cell-mediated immune events in the domestic pig. **Proc Soc Exp Biol Med**. Japan. v.177. p.156-164.1984

WITCHER, KG.; BRAY, CE.; CHUNCHAI, T.; ZHAO, F.; O'NEIL, SM.; GORDILLO, AJ.; CAMPBELL, WA.; MCKIM, DB.; LIU, X.; DZIABIS, JE.; QUAN, N.; EIFERMAN, DS.; FISCHER, AJ.; KOKIKO-COCHRAN, ON.; ASKWITH, C.; GODBOUT, JP. Traumatic Brain Injury Causes Chronic Cortical Inflammation and Neuronal Dysfunction Mediated by Microglia. **J Neurosci**. Ohio. v.17. p.41-47. 2021.

WOCHNIK, G.M; J. RÜEGG, G.A.; ABEL, U; SCHMIDT, F; HOLLSBOER, T. Rein, FK506- binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells, **J. Biol. Chem**. Germany. v. 280. p. 4609-4616.2005.

YANG, L; ZHAO, Y; WANG, Y; LIU, L; ZHANG, X; LI, B; CUI, R. The Effects of Psychological Stress on Depression. **Curr Neuropharmacol**. China.v.13. p. 494-504. 2015.

XU,M.; ZHANG, X.; HONG, R.; SU, DM.; WANG, L. MicroRNAs Regulate Thymic Epithelium in Age-Related Thymic Involution via Down- or Upregulation of Transcription Factors. **J Immunol Res**. China.v.10. 2017.

YU, J; REN, L; MIN, S; LV, F; LUO, J; LI, P; ZHANG, L. CB1 receptor inhibition alleviates memory impairment induced by electroconvulsive shock regulating hippocampal synaptic plasticity in depressed rats. **Psychiatry Research**. China. p.1-9, 2021.

ZHANG, Y.; XU, H.; ZHANG, F.; SHAO, F.; ELLENBROEK, B.; WANG, J.; WANG, W. Deficiencies of microglia and TNF α in the mPFC-mediated cognitive inflexibility induced by social stress during adolescence. **Brain Behav Immun**. Beijing. v.79. p. 256-266. 2019.

ANEXO A – Aprovação CEUA UNIFAL/MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Participação do receptor CB1 nas respostas homeostáticas induzidas por estresse de contenção**, registrada com o nº **0030/2020**, sob a responsabilidade de **Silvia Graciela Ruginsk Leitão**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/02/2021 a 31/01/2024**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Rodent / Wistar	116	116	0	Biotério central da universidade federal de alfenas

Alfenas, 13 de Maio de 2021

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira

Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://biobanco.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidade/certificado/> e digite a chave: 5e563238e4e2aa2033b015c8bb44fe0f