UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**Papel do vermis anterior cerebelar na modulação das respostas autonômicas,
neuroendócrina e comportamental ocasionadas pelo estresse de restrição em ratos.**

Maysa Zucon da Silva

RIBEIRÃO PRETO

2019

Maysa Zucon da Silva

Papel do vermis anterior cerebelar na modulação das respostas autonômicas, neuroendócrina e comportamental ocasionadas pelo estresse de restrição em ratos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa.

RIBEIRÃO PRETO
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Zucon, Maysa da Silva

Papel do vermis anterior cerebelar na modulação das respostas autonômicas, neuroendócrina e comportamental ocasionadas pelo estresse de restrição em ratos. Ribeirão Preto, 2019.

108 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Corrêa, Fernando Morgan de Aguiar.

1. Cerebelo. 2. Vermis cerebelar. 3. Estresse de Restrição. 4. Cardiovascular. 5. Sistema Nervoso Autonomo.

Zucon, Maysa da Silva

Papel do vermis anterior cerebelar na modulação das respostas autonômicas, neuroendócrina e comportamental ocasionadas pelo estresse de restrição em ratos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em: __/__/2019.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Benedito Honorio Machado

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Laurival Antonio De Luca Junior

Instituição: UNESP – Campus Araraquara Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais,

Minha referência de vida e amor incondicional. A vocês, meus eternos heróis, todo meu carinho, admiração e gratidão. Muito obrigada por tudo que significam para mim!

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao meu Deus pelo dom da vida, pela capacidade do conhecimento, pela saúde, pela força e pelo crescimento espiritual. Seu amor de Pai me sustentou até aqui, me amparando nos dias difíceis, aliviando meu coração ansioso, me protegendo nas inúmeras viagens e não deixando que eu desistisse. Obrigada meu eterno Pai! Obrigada minha mãezinha em espírito, Nossa Senhora Aparecida por interceder por minha vida, por me cobrir com seu manto sagrado e me proteger de todo e qualquer mal. Obrigada por todas as bênçãos recebidas.

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar até aqui sem o precioso apoio de várias pessoas importantes:

Especialmente, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa, pela oportunidade, orientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes. Obrigada pela confiança e por me atender e ouvir com paciência todas as vezes que bati em sua porta. Agradeço pelos ensinamentos compartilhados, e por guiar-me nos meus primeiros passos da pós-graduação. Meu eterno agradecimento!

Agradeço à minha mãe, Eneida, minha melhor amiga, exemplo de vida, superação e cuidado. Espelho-me na sua garra, no seu coração apaixonado e seu amor inesgotável. Você foi minha fortaleza durante todo esse período, mesmo longe estive me cuidando e me protegendo. Obrigada por todo amor e apoio incondicional. Amo você!

Ao meu pai, Edesilton, meu eterno herói. Agradeço pela torcida, ainda que silenciosa, pelos ensinamentos diários, pelo amor e pela confiança. Com você aprendi a ser determinada e lutar pelos meus sonhos. Agradeço por fazer de mim uma filha tão amada!

À minha irmã Mariany, minha companheira de todas as horas, agradeço pela cumplicidade, pelo apoio e pelo carinho. Você é tudo que sempre pedi a Deus, minha melhor amiga e meu eterno amor. Obrigada por me fazer enxergar o melhor de mim!

Obrigada ao meu amor, Vinícius, por toda paciência, por compreender minha ausência, e principalmente por acreditar no meu potencial e estar ao meu lado me ajudando e me amando. Sem seu apoio eu não conseguiria chegar aqui, você foi essencial nessa caminhada. Acreditou na minha capacidade quando eu mesma não enxergava, fez dos meus sonhos os seus. Obrigada por ser meu melhor amigo, meu grande amor e companheiro de vida. Que essa seja uma das muitas vitórias que iremos conquistar juntos. Te amo!

Aos meus avós, meus grandes amores. Vovô Pedro por ser minha referência de humildade e simplicidade. Minha vovó Quinha, agradeço pelas orações, por me educar na fé e no amor, a senhora é meu exemplo!

Ao amor da minha vida, minha Luna. Você faz a vida mais feliz, mais leve e cheia de amor. Meu amor incondicional, minha companheira de viagens e da vida, eu te amo demais. Obrigada por ser o amorzinho da mamãe e cuidar de mim!

A minha eterna “prof”, professora/orientadora/amiga Prof^a Dra. Milena Deolindo, que me apresentou a farmacologia e a pesquisa. Um obrigado nunca será suficiente por tudo que fez e faz por mim, você é iluminada e me espelho em você para seguir minha vida acadêmica. Obrigada pela amizade construída, pelo carinho e confiança sempre. Você acredita no meu potencial e me incentiva a ser uma profissional e um ser humano cada vez melhor. Minha eterna gratidão!

Aos meus amigos do laboratório: Taíz, Cris, Eduardo, América e Ivaldo: obrigada por toda ajuda, pelo suporte nos momentos difíceis, pela companhia durante os cafés, pela descontração, pelos ensinamentos e risadas compartilhadas. Vocês são muito especiais e tornaram essa caminhada mais agradável e tranquila. Guardo cada um no coração com muito carinho!

Agradeço em especial à minha colaboradora Me. Taiz Francine Brasil por todos os ensinamentos, pela paciência, apoio incondicional, pelas risadas e pela amizade construída. Sem seu apoio eu não conseguiria chegar até aqui. Obrigada pela parceria científica, mas principalmente pela parceria fora do laboratório, encontrei em você uma amiga querida para toda vida. Muito obrigada por tudo!

Aos docentes do departamento de farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP que contribuíram para minha formação acadêmica. Em especial, aos professores: Dr. Alexandre Pinto Corrado, nosso querido “mestrão” pelos ensinamentos, pelas risadas e pela oportunidade de aprender tanto com sua experiência acadêmica e científica; e ao Dr. Leonardo Resstel pela assessoria, pelos ensinamentos compartilhados e pelo apoio durante essa jornada.

Agradeço a nossa querida técnica Ivanilda Fortunato, a Vá, pela amizade construída, pelo suporte técnico, companheirismo e apoio, os quais foram essenciais em todas as etapas do trabalho. Muito obrigada de coração!

À Diva, por tratar com carinho nosso material e alegrar nossos dias com sua felicidade contagiante.

Aos técnicos do biotério, Eliana e Orlandinho por cuidarem com respeito e carinho de nossos animais.

À Gislaine P. M. Marques e Waldik Ramon pela atenção, disponibilidade e paciência.

Aos funcionários da portaria, aos guardas da portaria e do campus, as auxiliares de limpeza e zeladores por cuidarem com tanto carinho da nossa segurança e do nosso local de estudo e trabalho. Além de sempre me receberem com sorrisos sinceros e cumprimentos alegres.

Ao laboratório do Prof. Dr. Leonardo Resstel pela colaboração realizada e pelos ensinamentos adquiridos, em especial à Me. Mayara Firmino pelo apoio, paciência e ensinamentos das análises, além do carinho para comigo.

Ao laboratório do Prof. Dr. Hélio Zangrossi pela colaboração para as análises comportamentais, em especial a Dra. Heloisa Helena, pela paciência, cuidado, disponibilidade e auxílio nos experimentos.

Ao laboratório do Prof. Dr. José Antunes Rodrigues pela colaboração para a análise neuroendócrina, em especial a técnica Maria Valci, a querida Val, pela disponibilidade, por todo auxílio, paciência e carinho durante os experimentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho. Não citarei nomes para não me esquecer de ninguém, mas guardo com carinho cada um que me deu apoio, incentivo e torceu por mim. Meu muito obrigada!

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Lista de Abreviaturas

HPA – eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

SNC – sistema nervoso central

PA – pressão arterial

FC – frequência cardíaca

TC – temperatura cutânea

VFC – variabilidade da frequência cardíaca

BRS – sensibilidade do barorreflexo

ER – estresse de restrição

PAS – pressão arterial sistólica

IP – intervalo de pulso

LCE – labirinto de cruz elevado

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

NTS – núcleo do trato solitário

CRF – fator liberador de corticotrofina

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

Resumo

RESUMO

Zucon, M.S. Papel do vermis anterior cerebelar na modulação das respostas autonômicas, neuroendócrina e comportamental ocasionadas pelo estresse de restrição em ratos. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O cerebelo apresenta estruturas heterogêneas em sua anatomia, sendo dividido sagitalmente em três regiões: vermis, paravermis e hemisfério. A função cerebelar, a nível de sistema nervoso central (SNC), promove principalmente ação sensório-motora, entretanto, evidências demonstraram também a participação do cerebelo em respostas autonômicas, cognitivas e emocionais. Diante disso, indícios demonstraram que as regiões cerebelares estão envolvidas no controle tanto das respostas cardiovasculares, como alterações na pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), assim como nos circuitos neuronais relacionados a situações comportamentais. Sabe-se que o cerebelo apresenta conexões neuronais com estruturas do SNC conhecidas por modular respostas desencadeadas pelo estresse. O estresse agudo de restrição (ER) é um modelo de estresse que promove aumento sustentado da PA e da FC, além de uma redução da temperatura cutânea (TC). O objetivo do presente estudo foi investigar o papel das regiões entre os lóbulos II-III e dos lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas (PA, FC, temperatura cutânea, variabilidade da frequência cardíaca e barorreflexo espontâneo), neuroendócrina e comportamental na condição sem estresse e durante ER, para tanto utilizando o cloreto de cobalto (CoCl_2), injetado localmente, como ferramenta farmacológica. A inibição da região entre os lóbulos II-III e IV-V por CoCl_2 durante condição sem estresse, não causou alterações autonômicas (PA, FC e TC) e neuroendócrina (corticosterona) significativas em ambas regiões. Porém, durante o ER o tratamento foi capaz de promover potencialização da PA e da FC; uma inibição da queda da TC e aumento da concentração de corticosterona ($p < 0,05$) na região entre os lóbulos II-III, e uma potencialização da PA junto à diminuição da resposta da FC, uma potencialização da queda da TC e uma diminuição na concentração de corticosterona ($p < 0,05$) nos lóbulos IV-V associada ao ER. Em relação à variabilidade da FC, a inibição da região IV-V evidenciou alteração na potência da banda de baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica (PAS) na condição sem estresse. Entretanto, não foi observada alterações na VFC com pré-tratamento com CoCl_2 nas regiões II-III e IV-V durante o ER. No que se refere ao barorreflexo espontâneo, a inibição da região entre os lóbulos II-III causou alterações no ganho total e no número de sequências UP, tanto na condição sem estresse quanto durante o ER. Em relação a inibição das regiões entre os lóbulos II-III e IV-V não promoveu alterações significativas nas respostas comportamentais mediadas no labirinto em cruz elevado (LCE) e no campo aberto. Os resultados indicam que as regiões entre os lóbulos II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar são capazes de modular parâmetros autonômicos (aumento de PA e FC; e queda da temperatura cutânea) e neuroendócrino durante o ER. Além disso, os achados da variabilidade da frequência cardíaca e do barorreflexo, possivelmente, refletem um predomínio da atividade cardíaca parassimpática no papel desempenhado por esta área

do cerebelo. Entretanto, ainda é necessária a determinação das possíveis vias cerebelares atuantes na modulação autonômica e comportamental para maior esclarecimento.

Palavras-chaves: vermis cerebelar, sistema nervoso autônomo, estresse de restrição, comportamento, neuroendócrino, variabilidade da frequência cardíaca, barorreflexo.

Abstract

ABSTRACT

Zucon, M.S. **Role of anterior cerebellar vermis in autonomic modulating, neuroendocrine and behavioral responses evoked by restraint stress in rats.** School of Medicine, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2019.

The cerebellum has heterogeneous structures in its anatomy, being sagittally divided into three regions: vermis, paravermis, and hemisphere. Cerebellar function, about the central nervous system (CNS), promotes mainly sensorimotor action; however, evidence also demonstrated the participation of the cerebellum in autonomic, cognitive and emotional responses. Thus, evidence has shown that cerebellar regions are involved in the control of both cardiovascular responses, such as changes in blood pressure (BP) and heart rate (HR), as well as neuronal circuits related to behavioral situations. The cerebellum is known to have neuronal connections with CNS structures known to modulate stress responses. Acute restraint stress (RS) is a stress model that promotes a sustained increase in BP and HR, as well as a reduction in tail skin temperature (CT). The aim of the present study was to investigate the role of regions between lobes II-III and lobes IV-V of the cerebellar anterior vermis on autonomic responses (BP, HR, tail skin temperature, heart rate variability and spontaneous baroreflex), neuroendocrine in stress-free condition and during restraint stress, using locally microinjected cobalt chloride (CoCl_2) as a pharmacological tool. Inhibition of the region between lobes II-III and IV-V by CoCl_2 during stress-free conditions did not cause significant autonomic and neuroendocrine (corticosterone) changes (BP, HR, and CT) in both regions. However, during RS the treatment was able to promote potentiation of BP and HR; an inhibition of CT drop and increased corticosterone concentration ($p < 0.05$) in the region between lobes II-III, and a potentiation of BP along with decreased HR response, a potentiation of decrease tail-skin temperature and a decrease on corticosterone concentration ($p < 0.05$) in lobules IV-V associated with RS. Regarding HR variability, inhibition of the IV-V region evidenced alteration in the low frequency (LF) power of the systolic blood pressure (SBP) in the stress-free condition. However, no changes in HRV with CoCl_2 pretreatment were observed in regions II-III and IV-V during RS. Regarding spontaneous baroreflex, the inhibition of the region between lobes II-III caused changes in the total gain and number of UP sequences, both in the stress-free condition and during the RE. Regarding the inhibition of regions between lobes II-II, I and IV-V did not promote significant changes in behavioral responses mediated in the elevated plus maze (EPM) and the open field. The results indicate that the regions between lobes II-III and IV-V of the cerebellar anterior vermis are capable of modulating autonomic parameters (increase in BP and HR; decrease in skin temperature) during RS. Furthermore, findings of heart rate variability and baroreflex activity possibly reflect a predominance of parasympathetic heart activity in the role played by this area of the cerebellum. However, it is still necessary to determine the possible cerebellar pathways acting on autonomic and behavioral modulation for further clarification.

Key-words: cerebellar vermis, autonomic nervous system, restraint stress, behavior, neuroendocrine, heart rate variability, baroreflex.

Sumário

Sumário

INTRODUÇÃO	23
OBJETIVOS	31
MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
1) Animais	33
2) Técnica de implante de cânula-guia no vermis cerebelar (lóbulos II-III e IV-V)	33
3) Canulação da artéria femoral.....	34
4) Registro da pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura cutânea	35
5) Dosagem de corticosterona.....	36
6) Técnica para microinjeção de drogas no vermis cerebelar	36
7) Estresse por Restrição	37
8) Labirinto em cruz elevado (LCE)	37
9) Campo Aberto.....	38
10) Teste de transição claro-escuro	38
11) Drogas utilizadas.	39
12) Determinação anatômica do sítio de injeção.....	39
13) Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo (BRS).	40
14) Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC).....	41
15) Análise estatística.	42
PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	45
1) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas e neuroendócrina na condição sem estresse.....	46
2) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos II-III e IV e V do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas e neuroendócrina ocasionadas pelo ER.....	46
3) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos II-III e IV e V do vermis anterior cerebelar sobre a resposta comportamental ocasionada pelo ER	47
RESULTADOS	48
1) Determinação do sítio de injeção das regiões entre os lóbulos II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar	49
2) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas(PA, FC, temperatura, variabilidade e barorreflexo espontâneo) e neuroendócrina basais (sem estresse).....	50

3) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas (PA, FC, temperatura, variabilidade da frequência cardíaca e barorreflexo espontâneo) e neuroendócrinas ocasionadas pelo ER	58
4) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas (PA, FC, temperatura, variabilidade e barorreflexo espontâneo) e neuroendócrina basais (sem estresse)	67
5) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas (PA, FC, temperatura, variabilidade da frequência cardíaca e barorreflexo espontâneo) e neuroendócrinas ocasionadas pelo ER	76
6) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar sobre a resposta comportamental ocasionada pelo ER.....	85
7) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos VI-V do vermis anterior cerebelar sobre a resposta comportamental ocasionada pelo ER.....	87
DISCUSSÃO	91
CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

Introdução

INTRODUÇÃO

O cerebelo apresenta heterogeneidade em suas estruturas, sendo dividido em três regiões longitudinais que percorrem da posição rostral até a caudal (APPS; HAWKES, 2009). A região central é conhecida como vermis ou cerebelo medial; em seguida, localiza-se o paravermis, também denominado cerebelo intermediário, e por fim, o hemisfério, na porção mais lateral. Anatomicamente, o cerebelo é dividido em dez lóbulos distribuídos como: lóbulo anterior (I a V), lóbulo posterior (VI a IX) e o lóbulo floculonodular (apenas X).(APPS; HAWKES, 2009; LAWRENSON et al., 2018; SANG et al., 2012; STOODLEY; VALERA; SCHMAHMANN, 2012).

A região mais superficial do cerebelo é chamada de córtex cerebelar, o qual é subdividido em três camadas: molecular, Purkinje e granular, sendo que as mesmas se diferenciam funcionalmente de acordo com as suas conexões.(ENGELHARDT; MOREIRA, 2009). Adjacente ao córtex cerebelar, localiza-se a substância branca, a qual apresenta fibras extrínsecas e intrínsecas. As fibras extrínsecas se caracterizam por projeções cerebelares para diversas regiões do cérebro, como a medula, o tronco cerebral e diencefalo, já as intrínsecas está relacionada com as regiões intracerebelares (ENGELHARDT; MOREIRA, 2009).

O cerebelo é conhecido principalmente por sua ação sensório-motora, exercendo influência na postura e no movimento (STOODLEY; SCHMAHMANN, 2010). Entretanto, estudos têm evidenciado a participação do cerebelo em diferentes respostas cognitivas, emocionais e autonômicas (DELGADO-GARCÍA, 2001; LAWRENSON et al., 2018; SANG et al., 2012; STOODLEY; SCHMAHMANN, 2010).

O sistema cardiovascular é regulado por diferentes fatores, dentre eles o sistema nervoso autônomo, o qual através de uma ampla rede de conexões controla suas principais funções (JORDAN, 1995; MCDUGALL et al., 2000). Neste sentido, o barorreflexo é um mecanismo neural de controle do sistema cardiovascular atuando por

meio da modulação do sistema nervoso simpático e parassimpático (CRESTANI et al., 2010; HAIBARA; SANTOS, 2000). O barorreflexo espontâneo é uma ferramenta que analisa a função autonômica, a qual se baseia na avaliação das flutuações espontâneas da PA e da FC (WICHTERLE et al., 2000), que podem ser alteradas durante situações de estresse (DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015). A avaliação da sensibilidade do barorreflexo (BRS) é realizada no domínio da frequência, onde séries de intervalos RR e o sinal de pressão de pulso periférico são verificados, simultaneamente, para analisar o mecanismo de modulação do sistema cardiovascular em um curto prazo (NOLLO et al., 2005). A linearidade entre as séries é reconhecida e avaliada pela função de coerência e função de transferência, onde a série de entrada é representada pela pressão sistólica e série de saída é retratada pelos intervalos RR (NOLLO et al., 2005). Outra técnica importante para avaliar a regulação do sistema nervoso autônomo é a variabilidade das variáveis cardiovasculares, como a PA e FC, a qual é visto atualmente como um importante método para o estudo da modulação autonômica cardíaca e vascular (KIM et al., 2009; PAGANI et al., 1986). O método possibilita a análise das flutuações de PA e FC em situações diversas de maneira não invasiva e seletiva (PAGANI et al., 1986; RINCON et al., 2017). A análise mais comumente utilizada da VFC e VPA baseia-se no domínio da frequência, onde as medidas de frequência cardíaca são obtidas através da soma da faixa de frequência principal no espectro de potência, a qual permite a identificação e quantificação de oscilações rítmicas em diferentes frequências a partir de uma sequência de consecutivos valores de FC, intervalo de pulso (IP) ou pressão arterial sistólica (PAS) (KIM et al., 2009; OLIVEIRA JÚNIOR, 2017; PAGANI et al., 1986). As diversas frequências encontradas podem representar a modulação autonômica, tanto simpática quanto parassimpática sobre atividade cardíaca (KIM et al., 2009; PAGANI et al., 1986).

Regiões cerebelares, em particular o vermis, estão envolvidas no controle das respostas cardiovasculares mediadas por atividade do sistema nervoso simpática, tais

como alterações na PA, fluxo sanguíneo e FC (NISIMARU; KATAYAMA, 1995). Além disso, o mapeamento cerebelar através de técnicas de lesões locais ou estimulações elétrica, química ou mecânica evidenciaram a participação de áreas cerebelares na modulação cardiovascular (NISIMARU, 2004). Em adição, estudos experimentais em animais têm demonstrado que a estimulação elétrica nos lóbulos I, II e III do vermis anterior de cães e do vermis posterior de coelhos anestesiados promovem alterações cardiovasculares (GHELARDUCCI; SEBASTIANI, 1996; NISIMARU; YAMAMOTO; SHIMOYAMA, 1984; SADAKANE; KONDO; NISIMARU, 2000). Também foi demonstrado que microinjeção de acetilcolina no córtex cerebelar de ratos anestesiados promoveu redução da PA (ZHOU et al., 2015). Esses resultados juntos demonstram o papel do cerebelo na modulação do sistema cardiovascular.

Em adição, estudos experimentais demonstraram que a estimulação elétrica em áreas cerebelares promoveu alterações na PA e no reflexo vasomotor, sugerindo a participação do cerebelo na modulação do barorreflexo (MORUZZI, 1940). Além disso, lesões parciais no vermis anterior cerebelar de gatos anestesiados promoveram atividade barorreflexa elevada (REIS; CUENOD, 1965; WILLIAMS; ROBINSON; LUTHERER, 1986). Logo, a hipótese inicial do presente estudo é que as regiões entre os lóbulos II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar estão envolvidas na modulação das respostas cardiovasculares (PA, FC, variabilidade da frequência cardíaca e barorreflexo espontâneo) em situações basais.

Além de modular o sistema cardiovascular, estudos em roedores também sugerem a importância do cerebelo nos circuitos neuronais relacionados a situações comportamentais (SACCHETTI; SACCO; STRATA, 2007). Através de lesões no vermis anterior e posterior cerebelar de ratos, foi possível observar menor comportamento de tigmotáxia em um modelo etiológico de ansiedade, o teste do campo aberto (SUPPLE; LEATON; FANSELOW, 1987). Estudos de neuroimagens demonstraram a participação

cerebelar nas respostas comportamentais relacionadas ao transtorno de pânico (KONISHI et al., 2014), ansiedade generalizada (ETKIN et al., 2009) e social (MORENO-RIUS, 2018; TALATI et al., 2013). Em adição, maior atividade cerebelar foi demonstrada em situações de estresse pós-traumático (BING et al., 2013; KE et al., 2016). Estes dados sugerem uma participação do cerebelo na modulação de respostas comportamentais ocasionadas por situações aversivas.

Sendo assim, o cerebelo apresenta conexões neuronais com estruturas do sistema nervoso central (SNC) como hipotálamo, amígdala e regiões do córtex cerebral, conhecidas por modular respostas desencadeadas por situações aversivas (FENDT; FANSELOW, 1999; FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009; IWATA et al., 1986; TAVARES; CORRÊA, 2006). Estudos de tracejamento e eletrofisiológicos evidenciaram interconexões cerebelares com o córtex cerebral e com a amígdala basolateral (FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009; SCHMAHMANN; PANDYA, 1995a; SNIDER; MAITI, 1976; TAVARES; CORRÊA, 2006). Em adição, estudos neuroanatômicas em diferentes espécies animais (BANGMA; DONKELAAR, 1982; DIETRICH; HAINES, 1986; DIETRICH; WIKLUND; HAINES, 1992; HAINES; SOWA; DIETRICH, 1985) evidenciaram a existência de conexões neuronais entre o cerebelo e o hipotálamo, em particular, com o núcleo paraventricular (PVN) (DIETRICH; WIKLUND; HAINES, 1992), uma estrutura importante no controle de respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais ocasionadas pelo estresse (BUSNARDO et al., 2010, 2013; BUSNARDO; TAVARES; CORREA, 2014).

O estresse é um fator ambiental decorrente de estímulos extrínsecos e intrínsecos capazes de promover o desequilíbrio homeostático do organismo, ativando processos de adaptação por meio de alterações fisiológicas e psicológicas sistêmicas (MARGIS et al., 2003; NICOLAIDES et al., 2015). A resposta ao estresse ocorre por meio de ações coordenadas da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e do sistema nervoso

autônomo (NICOLAIDES et al., 2015). A ativação do eixo HPA se inicia com a ativação dos neurônios parvocelulares neuroendócrinos do PVN, os quais liberam o fator liberador de corticotrofina (CRF) que, por sua vez, estimulam a pituitária anterior a secretar hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) no sangue (BARRON; VAN LOON, 1989; DOS REIS et al., 2014). Após sua liberação na corrente sanguínea, o hormônio ACTH promoverá a liberação de glicocorticóides (cortisol em humanos, corticosterona em roedores) do córtex da glândula adrenal, que atuarão, sobretudo, mobilizando as reservas de energia (GUEST et al., 2013; MARGIS et al., 2003).

Além disso, os neurônios parvocelulares do PVN desencadeiam respostas simpato-excitatórias através de suas projeções para o tronco cerebral e medula espinhal, levando a estimulação da terminação nervosa simpática e secreção de catecolaminas sistêmica pela medula da adrenal, promovendo vasoconstrição, elevação da PA e FC, midríase e elevação da frequência respiratória (BARRON; VAN LOON, 1989; DOS REIS et al., 2014). Dessa forma, o PVN é considerado uma estrutura chave no controle das respostas ao estresse, e uma vez que existem conexões neuronais entre o cerebelo e o PVN, é possível sugerir uma participação do cerebelo em respostas desencadeadas por situações de estresse.

Neste sentido, foi demonstrado que a ablação cerebelar alterou a resposta bradicárdica condicionada em modelo de condicionamento ao contexto (SUPPLE; LEATON, 1990a, 1990b). Recentemente, foi demonstrado que a microinjeção de adrenomedulina, um neuropeptídeo hipotensor, no vermis anterior cerebelar de ratos normotensos e hipertensos ocasionou redução da resposta pressora em ratos normotensos e hipertensos em uma situação de estresse agudo produzido por choque nas patas, evidenciando um efeito modulador do cerebelo sobre as respostas cardiovasculares desencadeadas pelo estresse (FIGUEIRA; ISRAEL, 2017).

O estresse de restrição (ER) se caracteriza por um estímulo aversivo e inescapável capaz de desencadear respostas autonômicas e emocionais, sendo utilizado em variados modelos experimentais de transtornos psiquiátricos como ansiedade (ER agudo e crônico) e depressão (ER crônico) (BUSNARDO; TAVARES; CORREA, 2014; CRESTANI et al., 2010). Como resposta autonômica ao ER observa-se elevação da PA e da FC, além de uma vasoconstrição cutânea ocasionada pelo redirecionamento do fluxo sanguíneo para órgãos importantes na resposta ao estresse, tal como a musculatura esquelética, promovendo uma vasoconstrição cutânea e consequente queda na temperatura periférica, mediante ativação do sistema simpático-adrenal (LONG; VANDER; KLUGER, 1990; MCDOUGALL et al., 2000; REIS et al., 2011).

Sabe-se que exposição a variados tipos de estressores ocasiona um comportamento ansiogênico em modelos experimentais de ansiedade (MARGIS et al., 2003). Foi demonstrado que a exposição ao ER, em particular, altera o comportamento de ratos quando submetidos ao teste do labirinto em cruz elevada, promovendo uma redução da atividade exploratória nos braços abertos, evidenciando o efeito ansiogênico deste modelo aversivo (BUSNARDO et al., 2013; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000; REIS et al., 2011).

Embora existam dados na literatura que mostram o envolvimento do cerebelo em respostas autonômicas ao estresse, os mecanismos neuromodulatórios envolvidos nestas respostas ao ER são desconhecidos. Portanto, a hipótese do presente estudo é que as regiões entre os lóbulos II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar estão envolvidas na modulação das respostas autonômicas (PA, FC, temperatura cutânea, variabilidade da frequência cardíaca e barorreflexo espontâneo), neuroendócrina (corticosterona) e comportamental ocasionadas pelo ER agudo.

Sendo assim, para avaliar a participação do cerebelo nas respostas autonômicas, neuroendócrina e comportamental será utilizado o cloreto de cobalto (CoCl_2), um

bloqueador agudo e inespecífico de neurotransmissões locais, por meio de competição com os canais de cálcio, necessários para liberação de neurotransmissores (KRETZ, 1984; TAVARES; CORRÊA, 2006). Essa ferramenta farmacológica tem sido amplamente empregada em estudos para demonstrar o papel de diversas estruturas do sistema nervoso central na modulação das respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse agudo de restrição em ratos (BUSNARDO et al., 2010; DEOLINDO et al., 2013; FASSINI et al., 2017; FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009).

Objetivos

OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos:

1. Estudar a participação da região entre os lóbulos II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas basais (PA, FC, temperatura cutânea, variabilidade da frequência cardíaca e barorreflexo espontâneo), através da microinjeção local de cloreto de cobalto (CoCl_2 , 1mM/1 μL), inibidor sináptico inespecífico.
2. Avaliar a participação a região entre os lóbulos II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas (PA, FC, temperatura cutânea, variabilidade da frequência cardíaca e barorreflexo espontâneo) e neuroendócrina (corticosterona) promovidas pelo ER, através da microinjeção local de cloreto de cobalto (CoCl_2 , 1mM/1 μL), inibidor sináptico inespecífico.
3. Analisar o papel dos lóbulos II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar, através da microinjeção local de cloreto de cobalto (CoCl_2 , 1mM/1 μL), sobre o efeito ansiogênico retardado ocasionado pelo estresse de restrição e observado 24 h após no teste do labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto e teste de transição claro-escuro.

Materiais e Métodos

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Animais

Os experimentos foram realizados em ratos machos *Sprague-Dawley* com peso variando entre 240-280g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da USP de Ribeirão Preto onde foram mantidos em caixas individuais, com alimentação de ração e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos à alternância de luz (12 h claro/12 h escuro). O protocolo para uso de animais em experimentação segue as normas da comissão de ética em experimentação animal (CETAE) e está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA), nº 198/2018.

2) Técnica de implante de cânula-guia no vermis cerebelar (lóbulos II-III e IV-V)

O anestésico utilizado para este procedimento cirúrgico foi ketamina-xilazina (solução de 5ml de ketamina a 10% e 1,6 mL de xilazina a 2%), onde foi administrado 10 mg/kg por via intraperitoneal. A cabeça do animal foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, Illinois, USA) e foi realizada a tricotomia, em seguida foi feita a assepsia do local com álcool a 70%. A seguir, foi injetado 0,3 mL de lidocaína, com vasoconstritor, subcutaneamente para anestesia local do escalpo. A calota craniana foi exposta por incisão, de aproximadamente 1,5 cm, na pele, afastando-se todo o periósteo. A assepsia local foi feita com salina e água oxigenada a 10%. As coordenadas utilizadas foram determinadas a partir do Atlas do cérebro de rato (PAXINOS; WATSON, 1997).

Microinjeção entre lóbulos II-III:

Ântero-posterior: -5,0 mm anterior em relação à interaural;

Lateral: zero em relação à interaural;

Vertical: +4,2 mm relação à interaural;

Abaixamento da barra do incisivo: -3,2 mm; e

Inclinação lateral: 0°.

Microinjeção entre lóbulos IV-V

Ântero-posterior: -2,6mm anterior em relação à interaural;

Lateral: zero em relação à interaural;

Vertical: +7,2 mm relação à interaural;

Abaixamento da barra do incisivo: -3,2 mm; e

Inclinação lateral: 0°.

Com o auxílio de broca odontológica, foi feita a trepanação do crânio e as cânulas guia foram introduzidas centralmente no vermis cerebelar. As cânulas são constituídas de segmentos de agulha hipodérmica com 11 mm (lóbulos IV-V) ou 14 mm (lóbulos II-III) de comprimento e 0,55 mm de diâmetro externo, 24G. Elas foram fixadas ao crânio com resina acrílica auto polimerizável e um pequeno parafuso foi fixado na calota craniana. Mandris com 0,2 mm de diâmetro externo e 11 ou 14 mm de comprimento foram introduzidos nas cânulas, com o objetivo de se evitar sua obstrução durante o período de recuperação pós-cirurgia. Ao final da cirurgia os animais receberam 0,3 mL de Pentabiótico^R veterinário (Fontoura-Wyeth, SP, Brasil, 80.000 UI i.m.) por via intramuscular e 2,5 mg/Kg do analgésico e anti-inflamatório flunixinina meglumina (Banamine, Schering-Plough, RJ, Brasil) por via subcutânea, onde 24 h após uma nova injeção foi realizada a fim de estender o período de analgesia para mínimo 48 h.

3) Canulação da artéria femoral.

Após quatro dias da cirurgia para implante da cânula-guia no crânio, os animais foram novamente anestesiados com ketamina-xilazina e foi realizado o implante cirúrgico de cânulas de polietileno através da artéria femoral. A cânula é constituída por segmento de polietileno PE-10 (4-5 cm) fundido a segmento de polietileno PE-50 (14-15 cm) (Clay Adams, Parsippany, New Jersey, EUA), sendo preenchida com salina (NaCl a 0,9%) contendo anticoagulante (5U/mL de heparina) e obstruída com um pino de metal. Para

profilaxia adequada foi administrado antiinflamatório não-esteroidal flunixin meglumine (2,5 mg/kg, s.c- Banamine, Schering Plough, Brazil). Após vinte e quatro horas após a implantação da cânulas na artéria, a mesma foi utilizada para realização dos registros dos parâmetros cardiovasculares.

4) Registro da pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura cutânea.

A cânula implantada na artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão arterial (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) por meio de um segmento de polietileno PE-50. A pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca (FC) foram registradas por meio de um pré-amplificador de um polígrafo HP7754-A (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizados (MP-100, Biopac Systems Inc., Goleta, Santa Barbara, CA, USA). A cânula implantada na artéria femoral foi conectada ao transdutor de pressão, onde para cada animal foi realizado o registro dos parâmetros basais da PA e FC por 10 min. Os animais permaneceram durante o registro basal em suas caixas individualmente.

Em seguida, foi realizada a microinjeção central da droga ou veículo na região entre as áreas II-III ou IV-V no vermis anterior cerebelar, administrada 10 min antes do estresse de restrição (ER). O animal, ainda conectado ao sistema de registro foi transferido para o tubo de restrição, onde permaneceu por 60 min.

Além dos parâmetros cardiovasculares, as variações de temperatura cutânea também foram registradas. A temperatura da cauda, variável da temperatura cutânea, foi registrada manualmente com uma câmera térmica Multi-Purpose Thermal Imager IRI 4010 (Infra Red Integrated Systems Ltd Park Circle, Tithe Barn Way Swan Valley Northampton, USA) a uma distância de 50 cm, de três em três minutos durante o período de registro da PA e FC basais e após a aplicação local da droga e de dez em dez minutos durante o período que o animal permaneceu no tubo de restrição.

5) Dosagem de corticosterona.

Para a dosagem plasmática de corticosterona, o sangue foi coletado diretamente da artéria femoral. As amostras de sangue (300µL) pela artéria femoral e armazenado em tubos plásticos com 5µL de heparina, e centrifugado a 2.000 x g durante 15 min, a 4°C. 25 µL de plasma foram separados e congelados (-20°C) até o momento da dosagem da concentração de corticosterona. As amostras foram coletadas em três tempos diferentes:

- no minuto -1: amostra coletada 10 minutos após a administração de droga ou veículo nas regiões entre as áreas II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar e imediatamente antes do animal ser submetido ao ER, para determinar o valor basal da corticosterona.
- no minuto 20: amostra coletada 20 minutos após o animal ser submetido ao ER, para aferir a alteração hormonal induzida por 20 minutos de ER.
- no minuto 40: amostra coletada 40 minutos após o animal ser submetido ao ER, para aferir a alteração hormonal induzida por 40 minutos de ER.
- no minuto 60: amostra coletada 60 minutos após o animal ser submetido ao ER, ou seja, o último minuto para finalizar o ER, para aferir a alteração hormonal induzida por 60 minutos de ER. A extração de corticosterona do plasma foi realizada com etanol e a concentração plasmática de corticosterona determinada por radioimunoensaio. E o método foi adaptado daquele previamente descrito por (Sarnyai et al., 1992). O anticorpo de corticosterona foi obtido na Sigma (St. Louis, MO,EUA),

6) Técnica para microinjeção de drogas no vermis cerebelar

Para microinjeção de drogas no vermis cerebelar, foi utilizada uma seringa de 1µL modelo KH-7001 (Hamilton, Reno, Nevada, USA) conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha microinjetora de metal (33 G). A agulha microinjetora foi 1,0 mm mais

longa do que a cânula guia. Todas as microinjeções foram aplicadas no volume de 250 nL.

7) Estresse por Restrição.

O tubo de restrição é constituído por um tubo cilíndrico de plástico, medindo 15 cm de comprimento e 6,5 cm de diâmetro. O rato permaneceu no tubo por 1 h, sendo a pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura cutânea registradas continuamente durante a sua permanência no tubo.

8) Labirinto em cruz elevado (LCE).

O teste de LCE foi conduzido como descrito pela literatura (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000). O labirinto em cruz elevado (LCE), consiste de um aparato construído em madeira, apresentando dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados (30x5x15 cm), ligados por uma plataforma central comum (5x5 cm) e elevado 50 cm do chão por um suporte de madeira. Os testes foram realizados sob condição de iluminação limitada. Os animais foram colocados no centro do labirinto e submetidos a uma única sessão experimental de 5 minutos para impedir habituação.

Após esse período, o labirinto era limpo cuidadosamente com papel toalha e álcool 70%. Roedores naturalmente evitam os braços abertos do LCE e drogas ansiolíticas tipicamente aumentam a exploração destes braços sem alterar o número de entradas no braço fechado (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; PELLOW et al., 1985). O software AnyMaze™ (versão 4.7, Stoelting) foi empregado para análise comportamental. Ele detecta a posição do animal no labirinto e calcula o número de entradas e tempo gasto nos braços abertos e fechados. A análise do comportamento foi avaliada e registrada seguindo os seguintes parâmetros: a frequência de entradas do animal nos braços abertos e fechados e tempo gasto despendido nas divisões. Os parâmetros comportamentais analisados foram analisados pelo software AnyMaze™ (versão 4.7,

Stoelting, Wood Dale, IL, USA): total de entrada nos braços fechados (frequência), % de entradas nos braços abertos e % de tempo gasto nos braços abertos, sendo realizado o cálculo da porcentagem de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (Entradas: $(\text{aberto}/\text{total}) \times 100$; Tempo: $(\text{tempo no compartimento}/300) \times 100$).

9) Campo Aberto

O teste foi desenvolvido por Hall (1936), o campo aberto compreende em uma arena quadrada de madeira, nas medidas de 60x60cm com paredes laterais de 40 cm de altura. O teste tem como objetivo confrontar o animal com a novidade de um ambiente desconhecido através de uma área aberta, no qual se observa comportamentos como locomoção (através da distância percorrida dentro da arena) e o tempo de permanência do animal no centro e na periferia da arena. Roedores apresentam maior preferência à periferia do que ao centro do aparato, apresentando tigmotáxia (maior contato com as paredes) (RAMOS et al., 1997). Sabe-se que um tempo maior de permanência do animal no centro da arena representam uma redução o comportamento ansiogênico, sendo assim esse teste foi utilizado como modelo de avaliação da ansiedade (LISTER, 1990). Os registros comportamentais foram analisados pelo software AnyMaze TM (versão 4.7, Stoelting, Wood Dale, IL, USA), onde foi avaliada a distância total de quadrantes Percorridos e o tempo nos quadrantes centrais e periféricos.

10) Teste de transição claro-escuro

O modelo de transição claro-escuro foi descrito inicialmente por Crawley e Goodwin (1980) para determinação dos efeitos ansiolíticos de algumas drogas. O modelo é baseado na aversão dos animais por regiões iluminadas (CRAWLEY; GOODWIN, 1980). O aparato consiste em uma caixa de madeira de 47 x 22 x 22 cm, composto por

dois compartimentos semelhantes, sendo um claro (cor branca) e outro escuro (cor preta), onde através dos dois compartimentos existe um espaço onde o animal é capaz de transitar entre os dois compartimentos. O número de transições para compartimento escuro em vez do claro se relaciona como um índice de atividade ansiolítica. Os registros comportamentais foram analisados pelo software AnyMaze TM (versão 4.7, Stoelting, Wood Dale, IL, USA), onde foi avaliada porcentagem de tempo gasto em cada compartimento (claro/escuro).

11) Drogas utilizadas.

- Cloreto de Cobalto (CoCl_2 , SIGMA, St. Louis, MO, USA), bloqueador não seletivo de sinapses (KRETZ, 1984). A dose de 1mM/100nL foi escolhida a partir de trabalhos em que a administração desta droga foi eficaz em bloquear a transmissão sináptica (TAVARES; CORRÊA, 2006).
- Tribromoetanol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), anestésico utilizado para os procedimentos cirúrgicos para análise comportamental.
- Uretana (Sigma, USA), anestésico utilizado para a perfusão dos animais.
- Quetamina e Xilazina (Syntec. Hortolândia, SP, Brasil), anestésico utilizado para os procedimentos cirúrgicos para análise dos parâmetros autonômicos.
- Pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, SP, Brasil), antibiótico administrado como profilático após a cirurgia estereotática.
- Banamine (Schering-Plough Veterinária, RJ, Brasil), analgésico administrado como profilático após cirurgias estereotática e canulação da arterial femoral.

12) Determinação anatômica do sítio de injeção

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg i.p., SIGMA, St. Louis, Missouri, USA). O corante azul de Evans a 1% foi injetado no

local da microinjeção da droga, para determinação do sítio de injeção. Em seguida, os ratos foram submetidos à perfusão cerebral. Para isso, a caixa torácica foi aberta para exposição do coração, e em seguida a aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática. Uma agulha para perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo, e uma incisão foi feita na aurícula direita para o escoamento do sangue e do perfusato. A perfusão foi realizada inicialmente com 20 mL de solução fisiológica de NaCl 0,9%, seguida por 20mL de solução tamponada de formalina a 10%. Posteriormente, os cérebros foram retirados da caixa craniana e pós-fixados em solução de perfusão. Os cérebros foram seccionados com o auxílio de um criostato (CM1900, Leica, Wetzlar, Alemanha). Foram feitas várias secções das áreas do vermis cerebelar estudadas, coradas com cresil violeta a 0,5% e analisadas utilizando-se o atlas (PAXINOS; WATSON, 1997) como referência.

13) Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo (BRS).

O barorreflexo espontâneo foi calculado no domínio do tempo através do método das sequências. As séries temporais de pressão arterial pulsátil (PAS) e intervalo de pulso (IP) foram realizadas pelo programa computacional específico (CardioSeries v2.4) desenvolvido por Daniel P.M Dias, da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). O programa realizou a busca por sequências de quatro ou mais batimentos que demonstravam elevações contínuas na PAS associadas por progressivos aumentos na IP. Quando observadas mudanças maiores ou iguais a 1mmHg para PAS e 1ms (IP) foram conceituadas as diferenças, apenas. A sensibilidade do barorreflexo foi avaliada diante da média do coeficiente angular da reta da regressão linear entre os resultados de PAS e IP de cada sequência demonstrada.

14) Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC).

A variabilidade da frequência cardíaca consiste na variabilidade do intervalo de pulso (IP) e pressão arterial sistólica (PAS), na qual foi realizada por um programa computacional próprio (CardioSeries v2.4) desenvolvido por Daniel P.M Dias, da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). O programa realizou uma análise da variabilidade da frequência cardíaca nos domínios do tempo e da frequência, proporcionando uma regulação precisa dos parâmetros relacionados avaliação no domínio da frequência. Foram empregados trechos com 5 min de duração com valores de PAS e IP que permaneceram uma estacionaridade pertinente. Em seguida, os valores de IP e PAS foram reamostrados em 10Hz por interpolação cúbica do tipo *spline* e as séries com dados interpolados serão fracionados em segmentos de 512 pontos com sobreposição de 50% (protocolo de Welch) para regularização do intervalo de tempo entre os batimentos. Posteriormente, cada porção foi observada em busca de transientes que pudessem afetar o cálculo da densidade espectral da potência. Um janelamento do tipo *Hanning* foi utilizado e em seguida cada fragmento estacionário de IP e PAS foram processados para análise espectral aplicando-se a Transformada Rápida de Fourier (FFT).

Os espectros do intervalo de pulso foram incorporados em bandas de baixa (*Low Frequency*: 0,20 – 0,75 Hz) e alta (*High Frequency*: 0,75 – 3,00 Hz) frequência, ao mesmo tempo que os espectros de PAS foram incluídos apenas na banda de baixa frequência. A média das potências dos espectros do IP nas bandas alta e baixa foi usada para expressão da potência do IP para cada animal. Logo, a média dos valores das potências dos espectros da PAS na banda baixa foi empregada na expressão da potência da PAS em cada animal.

15)Análise estatística.

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa Prism (GraphPad, USA). O teste de análise de variância de um fator (one-way ANOVA) ou teste t de *Student* foram utilizados para comparar os valores basais de PA, FC, TC e corticosterona após a microinjeção de droga ou veículo. As alterações autonômicas e hormonais foram analisadas pelo teste de análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) aplicando os fatores de tratamento (veículo ou droga) e o tempo como medida repetida, seguido pelo pós-teste de Fisher.

Os valores de PA, FC e TC foram ininterruptamente registrados por 10 min antes da microinjeção dos tratamentos nas regiões entre as áreas II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar (basal), 10 min depois do tratamento e 60 min durante o estresse de restrição.

Os dados foram representados como média e erro padrão da média (EPM) das variações de PAM, FC ou TC a partir da linha basal (Δ PA, Δ FC e Δ TC). Dados de PAM e FC foram coletados com amostragem de 1 ponto por minuto. Para fins estatísticos, as curvas de PAM e FC de 70 pontos foram reconstruídas com 20 pontos. Os dois primeiros pontos correspondem ao período basal que antecede o início do estresse de restrição, enquanto os pontos restantes correspondem ao período de restrição. Os valores de corticosterona medidos a partir de amostras coletadas 10 min após a microinjeção das drogas nas regiões entre as áreas II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar (basal=-1), 20 minutos (estresse, t = 20 min), 40 minutos (estresse, t = 40 min) e 60 min (estresse, t = 60 min) após os animais serem submetidos ao estresse de restrição. Os dados foram expressos como média EPM dos valores de corticosterona. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram $p < 0,05$.

Para análise comportamental, os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. A porcentagem de entradas ($100 \times \text{aberto} / \text{total de entradas}$) e o tempo despendido nos braços abertos ($100 \times \text{aberto} / \text{aberto} + \text{fechado}$) do LCE foram calculados para cada rato.

Estes dados, juntamente com o número de entradas nos braços fechados, foram analisados pela análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Duncan. A distância percorrida dentro da arena do campo aberto, o tempo de permanência no centro e na periferia foram calculados para cada animal. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo pós-teste de Duncan. Os dados do teste de transição claro-escuro, como o tempo de transição no compartimento iluminado ou escuro, foram analisados através da ANOVA de uma via (one-way) seguido pelo pós-teste de Duncan. O nível de significância assumido para todos os testes comportamentais foi de $p < 0,05$.

Protocolos Experimentais

PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos experimentos, os animais foram levados, em suas respectivas caixas, à sala de experimentação. Cada animal foi conectado ao sistema de registro da pressão arterial para registro da pressão arterial pulsátil (PAP), FC e temperatura cutânea basal por 10 min, permanecendo em suas respectivas caixas, e ao longo de todo o período experimental. Para os protocolos de ER, uma amostra sanguínea foi coletada um minuto antes do animal ser submetido ao estresse de restrição para dosagem basal dos níveis de corticosterona. Em seguida, ainda conectado ao sistema de registro da pressão arterial, o animal foi transferido para o tubo de restrição, onde permaneceu por 60 min. A PA, FC e temperatura cutânea foram registradas durante todo o período de restrição, enquanto as amostras sanguíneas foram coletadas nos minutos -1, 20, 40 e 60 para análise neuroendócrina. Foi realizada apenas uma microinjeção central de droga ou veículo por animal, administrada 10 min antes da restrição. Para o protocolo comportamental, os animais foram microinjetados e 10min após foram submetidos ao ER por 120 minutos. Vinte e quatro horas após, foram submetidos ao teste do labirinto de cruz elevada para análise da resposta comportamental.

Um grupo distinto de animais foi utilizado para avaliar o comportamento tipo ansiogênico observado 24h após a exposição ao ER. Após cinco dias da cirurgia esterotáxica para implantação da canula-guia, os animais foram isolados em suas caixas 24 h para habituação do ambiente com som e iluminação reduzida. No dia seguinte, os animais receberam droga ou veículo (250 nL) e 10 min após a microinjeção, foram submetidos ao ER por 120 min. Vinte e quatro horas após o ER, os animais foram submetidos ao teste do labirinto de cruz elevada (LCE) por 5 min e em seguida, ao teste do campo aberto por mais 5 min. Um grupo não-estressado e sem implantação da canula-guia (*naïve*) foi utilizado como controle.

1) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas e neuroendócrina na condição sem estresse.

Este protocolo teve por objetivo determinar se as regiões entre os lóbulos II-III e IV-V do vermis cerebelar estão envolvidas na manutenção das respostas autonômicas (PA, FC, temperatura cutânea, variabilidade da FC e barorreflexo espontâneo) e neuroendócrina (corticosterona). Para isso, os animais foram microinjetados com droga ou veículo na região entre os lóbulos II-III ou IV-V e, após o tratamento, parâmetros fisiológicos dos animais foram registrados por 70 min em suas caixas individuais. Para cada região estudada, os animais foram divididos em dois grupos experimentais: 1) Veículo (ACSF, 250 nL) ou 2) CoCl_2 , (1 mM/250nL) (RESSTEL; FERNANDES; CORRÊA, 2004; TAVARES; CORRÊA, 2006).

2) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos II-III e IV e V do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas e neuroendócrina ocasionadas pelo ER.

Este protocolo teve por objetivo determinar se a região entre os lóbulos II-III e IV e V do vermis cerebelar está envolvida na modulação das respostas autonômicas (PA, FC, temperatura cutânea, variabilidade da FC e barorreflexo espontâneo) e neuroendócrina induzidas pelo ER. Para isso os animais foram microinjetados com droga ou veículo na região entre os lóbulos II-III ou IV-V e 10 min após o tratamento, os animais foram submetidos ao estresse de restrição por 60 min. Para cada região estudada, os animais foram divididos em dois grupos experimentais: 1) Veículo (ACSF, 250 nL) + ER ou 2) CoCl_2 , (1mM/250nL) + ER (RESSTEL; FERNANDES; CORRÊA, 2004; TAVARES; CORRÊA, 2006).

3) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos II-III e IV e V do vermis anterior cerebelar sobre a resposta comportamental ocasionada pelo ER.

Este protocolo teve por objetivo determinar se a região entre os lóbulos II-III e IV e V do vermis cerebelar está envolvida no efeito ansiogênico retardado ocasionado pelo estresse de restrição, por meio do teste comportamental labirinto em cruz elevado (LCE). Para isso os animais foram microinjetados com droga ou veículo na região entre os lóbulos II-III ou IV-V e 10 min após o tratamento, os animais foram submetidos ao estresse de restrição por 120 min. Vinte e quatro horas após a sessão de estresse, os animais foram avaliados no LCE, campo aberto e claro-escuro. Para cada região estudada, os animais foram divididos em três grupos experimentais: 1) *Naïve*, os animais que não foram submetidos ao ER; 2) Veículo (ACSF, 250 nL) + ER ou 2) CoCl_2 +ER, (1mM/250nL) (RESSTEL; FERNANDES; CORRÊA, 2004; TAVARES; CORRÊA, 2006).

Resultados

RESULTADOS

1) Determinação do sítio de injeção das regiões entre os lóbulos II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar

FIGURA 1 - Representação diagramática dos sítios de microinjeção do veículo (círculos brancos) e do cloreto de cobalto (círculos pretos) nas regiões entre os lóbulos II e III (A) e os lóbulos IV-V (B) do vermis anterior cerebelar. Figuras baseadas no atlas do cérebro de rato Paxinos e Watson (1997). Lób II – lóbulo II, Lób III – lóbulo III, lób IV- lóbulo IV, lób V – lóbulo V, IA – interaural.

FIGURA 2 - Fotomicrografia representativa de uma seccção coronal do cérebro de rato demonstrando o sítio da microinjeção nas regiões entre os lóbulos II-III (A) e dos lóbulos IV-V (B).

2) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas (PA, FC, temperatura, variabilidade e barorreflexo espontâneo) e neuroendócrina basais (sem estresse).

2.1) Pressão Arterial, Frequência Cardíaca e Temperatura Cutânea

A microinjeção de ACSF e cloreto de cobalto na dosagem 1 mM/250nL não alterou os valores basais da PAM, FC e TC na condição sem estresse ($p>0,05$), conforme representado na tabela 1.

Tabela 1 - Valores basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea (TC) antes e após a microinjeção de cloreto de cobalto (inibidor sináptico inespecífico) na região entre lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar.

Nmol/250nL n		PAM				FC				TC			
		Antes±EPM (mmHg)	Após±EPM (mmHg)	t=	P=	Antes±EPM (bpm)	Após±EPM (bpm)	t=	p=	Antes±EPM (C°)	Após±EPM (C°)	t=	p=
Cobalto													
s/ estresse	5	108,6±1,403	110,2±1,398	8,3	0,2426	339,9±5,888	335,5±6,725	0,7	0,497	29,87±0,5169	28,57±0,1533	2,4	0,088
Veiculo s/ estresse	5	97,34±1,574	94,58±1,131	2,1	0,1219	325,3,9±2,123	325,7±2,731	0,2	0,855	29,19±0,3277	28,47±0,0992	1,7	0,179

A análise de two-way ANOVA demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto na dose de 1mM /250 nL não promoveu alterações na resposta pressora, em função do tempo (tratamento: $F_{(1,8)} = 1,236$, $p>0,05$; tempo: $F_{(19,152)} = 3,120$, $p<0,05$; interação: $F_{(19,152)} = 1,273$, $p>0,05$) além de não provocar alterações na frequência cardíaca (tratamento: $F_{(1,10)} = 0,04537$, $p>0,05$; tempo: $F_{(19,190)} = 1,987$, $p<0,05$; interação: $F_{(19,190)} = 0,6619$, $p>0,05$) mediante sua condição não estressora, durante o período de 60 min dentro da caixa. Em adição, o tratamento não promoveu alterações na temperatura cutânea quando comparado ao controle (tratamento: $F_{(1,8)} = 0,5308$, $p>0,05$; tempo: $F_{(12,96)} = 1,823$, $p<0,05$; interação: $F_{(12, 96)} = 0,8649$, $p>0,05$). O cloreto de cobalto não foi capaz de promover alterações nas respostas autonômicas durante a

permanência do animal em sua caixa ($p>0,05$) (Figura 3).

FIGURA 3- Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea (Δ TC) ao longo do tempo, de animais em suas caixas, pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250nL (esferas pretas, $n=5$) ou veículo ACSF (esferas brancas, $n=5$). Pontos representam as médias e as barras o EPM. $p>0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguido por pós-teste de Fisher LSD.

2.3) – Variabilidade da Frequência Cardíaca (PAS e IP)

A análise de variância, two-way ANOVA para medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar não apresentou diferença nas análises da PAS ($F_{(1,8)} = 0,01584$; $P > 0,05$), da variabilidade total da PAS ($F_{(1,8)} = 1,690$; $P > 0,05$), além de não influenciar na potência da banda LF ($F_{(1,8)} = 0,3104$; $P > 0,05$) quando analisados na situação sem estresse (figuras 4, 5 e 6).

No que se refere ao intervalo de pulso, a análise demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1mM/250 nL) na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar não apresentou alteração no IP ($F_{(1,8)} = 0,1594$; $p > 0,05$;) além de não promover alterações na variabilidade total do IP ($F_{(1,8)} = 0,1015$; $p > 0,05$), quando comparado ao grupo controle na situação sem estresse (figura 5). Além disso, não foi possível observar alteração na potência da banda LF ($F_{(1,8)} = 0,08497$; $p > 0,05$) quanto da potência da banda de HF ($F_{(1,8)} = 0,01107$; $p > 0,05$) do IP em valores absolutos quando comparado ao controle (figura 7).

Em relação à potência das bandas de LF e HF dentro do espectro do intervalo de pulso, descritas em unidades normalizadas, a análise de duas vias para medidas repetidas, seguida do pós-teste de Fisher (ANOVA two-way), não demonstrou alteração significativa de LF ($F_{(1,8)} = 0,4932$; $P > 0,05$) e HF ($F_{(1,8)} = 0,4932$; $p > 0,05$), assim como na razão entre ambas potências LF/HF ($F_{(1,8)} = 0,3179$; $p > 0,05$), não havendo diferença quando comparado ao grupo controle (figura 8).

2.4) Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo (BRS)

A análise de variância, two-way ANOVA para medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1mM/250 nL) na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar apresentou um aumento no ganho total ($F_{(1,8)} = 5,798$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle no momento pós-droga. Além disso, foi possível

observar alteração no número de sequências UP ($F_{(1,8)} = 3,872$, $p < 0,05$) em relação ao tratamento $F_{(1,8)} = 2,578$, $p < 0,05$) (sem estresse) observada no pós-teste de Fisher LSD; entretanto, não foi possível observar alterações no número de sequências DOWN ($F_{(1,8)} = 1,517$, $p > 0,05$), quando comparado ao controle (figura 9).

No que se refere ao índice de efetividade do barorreflexo, a análise estatística (two-way ANOVA para medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Fisher LSD) não demonstrou alteração quanto ao número de sequências barorreflexa relacionadas ao ganho total ($F_{(1,8)} = 3,872$, $P > 0,05$), sem variações nas sequências UP ($F_{(1,8)} = 3,872$, $p > 0,05$) e nas sequências DOWN ($F_{(1,8)} = 3,872$, $p > 0,05$), quando comparado ao grupo controle (figura 10).

FIGURA 4 – Pressão arterial sistólica (PAS) de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL. As colunas representam média $\pm$ EPM dos grupos controle ($n=5$) e cobalto ($n=5$). $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguido por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 5 – Variabilidade total da pressão arterial sistólica (PAS) de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL. As colunas representam média $\pm$ EPM dos grupos controle ($n=5$) e cobalto ($n=5$).

$p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 6 – Potência da banda de baixa frequência (LF) do espectro da pressão arterial sistólica (PAS) de animais em suas caixas (condição sem estresse), pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 7 – (A) Intervalo de pulso (IP) e (B) Variabilidade total do intervalo de pulso de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL. As colunas representam média $\pm$ EPM dos grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 8 – (A) Potência da banda de baixa frequência (LF) (B) e alta frequência (HF) do espectro do intervalo de pulso de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 9 – (A) Potência da banda de baixa frequência (LF), (B) alta frequência (HF) em unidades normalizadas e (C) relação entre as potências LF e HF do espectro intervalo de pulso de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $P > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 10 – (A) Ganho total das sequências barorreflexas; (B) ganho das sequências UP e (C) ganho das sequências DOWN de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 11 – (A) Índice de efetividade do barorreflexo total (BEI), (B) BEI das sequências barorreflexas UP e (C) BEI de sequências barorreflexa DOWN de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $P > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

2.5) Dosagem de Corticosterona

A análise de two-way ANOVA indicou que o tratamento com cloreto de cobalto na dose de 1mM /250 nL não promoveu alteração na concentração de corticosterona, em função do tempo (tratamento: $F_{(1, 8)} = 0,3785$, $p > 0,05$; tempo: $F_{(3, 24)} = 39,75$, $p > 0,05$; interação: $F_{(3, 24)} = 0,3777$, $p > 0,05$), quando comparada ao controle quando os animais foram submetidos a condição sem estresse (figura 12).

FIGURA 12 – Concentração de corticosterona no plasma de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $P > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

3) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas (PA, FC, temperatura, variabilidade da frequência cardíaca e barorreflexo espontâneo) e neuroendócrinas ocasionadas pelo ER.

3.1) Pressão Arterial, Frequência Cardíaca e Temperatura Cutânea

A microinjeção de ACSF e cloreto de cobalto na dosagem 1mM/250nL não alterou os valores basais da PAM, FC e TC ($p < 0,05$), conforme representado na tabela 2.

Tabela 2 - Valores basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea (TC) antes e após a microinjeção de cloreto de cobalto (inibidor sináptico inespecífico) na região entre lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar.

Nmol/250nL	n	PAM		FC		TC		t=	P=	Antes±EPM (mmHg)	Após±EPM (mmHg)	t=	P=
		Antes±EPM (mmHg)	Após±EPM (mmHg)	Antes±EPM (bpm)	Após±EPM (bpm)	Antes±EPM (C°)	Após±EPM (C°)						
Cobalto ER	5	96,90±0,449	114,7±2,023	16,0	0,15	290,8±5,369	463,7±24,41	13,3	0,0009	31,74±0,2041	31,47±0,0618	1,8	0,1586
Veiculo ER	5	101,1±0,612	118,77±2,613	12,4	0,11	320,2±12,57	463,7±24,41	8,3	0,0036	32,06±0,2545	31,68±0,1400	2,3	0,1026

A análise de two-way ANOVA indicou que o tratamento com cloreto de cobalto na dose de 1mM /250 nL potencializou a resposta pressora, em função do tempo (tratamento: $F_{(1,160)} = 12,93$, $p < 0,05$; tempo: $F_{(19,160)} = 7,566$, $p < 0,05$; interação: $F_{(19,160)} = 1,307$, $p > 0,05$), também promoveu a potencialização da resposta taquicárdica (tratamento: $F_{(1,160)} = 10,32$, $p < 0,05$; tempo: $F_{(19,160)} = 12,26$, $p < 0,05$; interação: $F_{(19,160)} = 0,9656$, $p > 0,05$) e um bloqueio da queda da temperatura cutânea (tratamento: $F_{(1,8)} = 9,845$, $p < 0,05$; tempo: $F_{(12,96)} = 5,356$, $p < 0,05$; interação: $F_{(19,160)} = 1,307$, $p > 0,05$) ocasionadas pela exposição aguda ao ER. Logo, o cloreto de cobalto na dosagem de 1mM /250 nL foi suficiente para ocasionar alterações nas respostas autonômicas induzidas pela situação aversiva presente ($p < 0,05$) (figura 13.)

FIGURA 13 – Variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea (Δ TC) ao longo do tempo de animais submetidos ao estresse de restrição e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL (esferas pretas, n=5) ou veículo ACSF (esferas brancas, n=5). No tempo de 0min os animais foram submetidos ao estresse de restrição. Pontos representam as médias e as barras o EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

3.2) Variabilidade da Frequência Cardíaca (PAS e IP).

Em relação ao grupo submetido ao ER, a análise estatística (ANOVA two-way para medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Fisher LSD) demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar não causou alterações da PAS ($F_{(1,8)} = 0,3247; p > 0,05$), na variabilidade da PAS ($F_{(1,8)} = 0,2177; p > 0,05$), além de não influenciar a potência da banda LF ($F_{(1,8)} = 0,02047; p > 0,05$) quando comparado ao grupo controle durante o ER (figuras 14, 15 e 16).

No que se refere ao intervalo de pulso, a análise de variância de dois fatores (ANOVA two-way para medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Fisher LSD) demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar não causou alteração no IP ($F_{(1,8)} = 0,1700; p > 0,05$;) e na variabilidade total do IP ($F_{(1,8)} = 0,2384; p > 0,05$) quando comparado ao grupo controle durante o ER (figura 17). Além disso, não foi possível observar alteração na potência da banda LF ($F_{(1,8)} = 0,2261; p > 0,05$) e da potência da banda de HF ($F_{(1,8)} = 0,01107; p > 0,05$) do IP em valores absolutos quando comparados ao controle durante ER (figura 18).

Em relação as potência das bandas de LF e HF dentro do espectro do intervalo de pulso, descritas em unidades normalizadas, a análise de duas vias por medidas repetidas seguida do pós-teste de Fisher (ANOVA two-way) não demonstrou alteração significativa de LF ($F_{(1,8)} = 0,5301; p > 0,05$) e HF ($F_{(1,8)} = 0,5301; p > 0,05$), assim como a na razão entre ambas potências LF/HF ($F_{(1,8)} = 0,3179; p > 0,05$) não houve diferença quando comparado com o grupo controle (figura 19).

3.3) Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo (BRS)

A análise de variância, two-way ANOVA para medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Fisher LSD demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL)

na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar apresentou um aumento no ganho total ($F_{(1,8)} = 8,191$; $p < 0,05$) nos últimos 20 min durante o ER quando comparado ao grupo controle. Além disso, foi possível observar alteração no número de sequências UP ($F_{(1,8)} = 8,656$; $p < 0,05$) em relação ao tratamento, entretanto o número de sequências DOWN ($F_{(1,8)} = 1,982$; $p > 0,05$) não demonstrou alterações (figura 20).

No que se refere ao índice de efetividade do barorreflexo, a análise estatística (two-way ANOVA para medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD) não demonstrou alteração ao número de sequências barorreflexas relacionadas ao ganho total ($F_{(1,8)} = 1,051$, $p > 0,05$), sem variações nas sequências UP ($F_{(1,8)} = 0,5564$, $p > 0,05$) e nas sequências DOWN ($F_{(1,8)} = 1,051$, $p > 0,05$) quando comparado ao grupo controle (figura 21).

FIGURA 14 – Pressão arterial sistólica (PAS) de animais submetidos ao ER e pré tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle ($n=5$) e cobalto ($n=5$). $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 15 – Variabilidade total da pressão arterial sistólica (PAS) de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 16 – Potência da banda de baixa frequência (LF) do espectro da pressão arterial sistólica (PAS) de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 17 – (A) Intervalo de pulso (IP) e (B) Variabilidade total do intervalo de pulso de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 18 – (A) Potência da banda de baixa frequência (LF) (B) e alta frequência (HF) do espectro do intervalo de pulso de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 19 – (A) Potência da banda de baixa frequência (LF), (B) alta frequência (HF) em unidades normalizadas e (C) relação entre as potências LF e HF do espectro intervalo de pulso de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 20 – (A) Ganho total das sequências barorreflexas; (B) ganho das sequências UP e (C) ganho das sequências DOWN de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 21 – (A) Índice de efetividade do barorreflexo total (BEI), (B) BEI das sequências barorreflexas UP e (C) BEI de sequências barorreflexa DOWN de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

3.5) Dosagem de Corticosterona

A análise de two-way ANOVA indicou que o tratamento com cloreto de cobalto na dose de 1mM /250 nL promoveu aumento na concentração de corticosterona nos minutos 20, 40 e 60min de ER, em função do tempo (tratamento: $F_{(1, 8)} = 4,241$, $p < 0,05$; tempo: $F_{(3, 24)} = 48,29$, $p < 0,05$; interação: $F_{(3, 24)} = 3,852$, $p < 0,05$), quando comparado ao controle durante o ER (figura 22).

FIGURA 22 – Concentração de corticosterona no plasma de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $P > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

4) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas (PA, FC, temperatura, variabilidade e barorreflexo espontâneo) e neuroendócrina basais (sem estresse).

4.1) – Pressão Arterial, Frequência Cardíaca e Temperatura Cutânea

A microinjeção de ACSF e cloreto de cobalto na dosagem 1 mM/250 nL não alterou os valores basais da PAM, FC e TC na condição sem estresse ($p>0,05$), conforme representado na tabela 3.

Tabela 3 - Valores basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) antes e após a microinjeção de cloreto de cobalto (inibidor sináptico inespecífico) na região entre lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar.

Nmol/250nL	n	PAM		FC				TC					
		Antes±EPM (mmHg)	Após±EPM (mmHg)	t=	P=	Antes±EPM (bpm)	Após±EPM (bpm)	t=	P=	Antes±EPM (C°)	Após±EPM (C°)	t=	P=
Cobalto s/ estresse	5	105,6±1,527	108,2±0,5357	1,8	0,1678	339,9±5,888	352,4±3,778	1,7	0,1735	28,73±0,09747	28,44±0,0936	6,7	0,1754
Veiculo s/ estresse	5	109,0±0,8888	107,2±1,475	1,7	0,1804	328,8±1,122	321,4±2,064	2,4	0,0909	29,64±0,2728	29,20±0,3534	0,8	0,4716

A análise de two-way ANOVA demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto na dose de 1 mM /250 nL não promoveu alterações na resposta pressora, em função do tempo (tratamento: $F_{(1,8)} = 0,005777$, $p>0,05$; tempo: $F_{(70,560)} = 1,811$, $p>0,05$; interação: $F_{(70, 560)} = 1,052$, $p>0,05$) além de não provocar alterações na frequência cardíaca (tratamento: $F_{(1, 8)} = 0,2971$, $p>0,05$; tempo: $F_{(70, 560)} = 1,495$, $p>0,05$; interação: $F_{(70, 560)} = 1,718$, $p>0,05$) e na temperatura cutânea (tratamento: $F_{(1,9)} = 0,3148$, $p>0,05$; tempo: $F_{(12,108)} = 1,465$, $p>0,05$; interação: $F_{(12, 108)} = 1,048$, $p>0,05$) mediante sua condição não estressora, durante o período de 60 minutos dentro da caixa. O cloreto de cobalto não foi capaz de promover alterações nas respostas autonômicas durante a permanência do animal em sua caixa ($p<0,05$) (figura 23).

FIGURA 23- Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo, de animais em suas caixas e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL (esferas pretas, n=5) ou veículo ACSF (esferas brancas, n=5). Pontos representam as médias e as barras o EPM.

4.2) – Variabilidade da Frequência Cardíaca (PAS e IP)

A análise de variância, two-way ANOVA para medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Fisher LSD demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar não apresentou diferença nas análises da PAS ($F_{(1,8)} = 0,01584$; $p > 0,05$), da variabilidade total da PAS ($F_{(1,8)} = 0,7939$; $p > 0,05$), entretanto houve uma alteração na potência da banda LF nos momentos 1, 2 e 3 ($F_{(1,8)} = 1,433$; $p < 0,05$) visualizada no pós-teste de Fisher LSD analisados na condição sem estresse (figuras 24, 25 e 26).

No que se refere ao intervalo de pulso, a análise demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar não apresentou alteração no IP ($F_{(1,8)} = 4,504$; $p > 0,05$;) e na variabilidade total ($F_{(1,8)} = 0,1130$; $p > 0,05$) quando comparado ao grupo controle na situação sem estresse (figura 25). Além disso, não foi possível observar alteração na potência da banda LF ($F_{(1,8)} = 0,01192$; $p > 0,05$) quanto da potência da banda de HF ($F_{(1,8)} = 2,257$; $p > 0,05$) do IP em valores absolutos quando comparado ao controle (figura 27).

Em relação a potência das bandas de LF e HF dentro do espectro do intervalo de pulso, descritas em unidades normalizadas, a análise de duas vias para medidas repetidas seguida do pós-teste de Fisher (ANOVA two-way) não demonstrou alteração significativa de LF ($F_{(1,8)} = 0,5886$; $p > 0,05$) e HF ($F_{(1,8)} = 0,5886$; $p > 0,05$), assim como a na razão entre ambas potências LF/HF ($F_{(1,8)} = 0,5094$; $p > 0,05$) não houve diferença quando comparado com o grupo controle (figura 28).

4.3) Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo (BRS)

A análise de variância, two-way ANOVA para medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar não demonstrou alterações relacionadas ao ganho total ($F_{(1,8)} = 0,1337$; $p > 0,05$), sem variações nas sequências UP ($F_{(1,8)} = 0,008198$; $p > 0,05$) e

nas sequências DOWN ($F_{(1,8)} = 0,6767$; $p > 0,05$) quando comparado ao grupo controle (figura 29).

No que se refere ao índice de efetividade do barorreflexo, a análise estatística (two-way ANOVA para medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Fisher LSD) o tratamento não apresentou alterações no ganho total ($F_{(1,8)} = 0,02110$; $p > 0,05$) quando comparado ao grupo controle na condição sem estresse. Além disso, não foi possível observar alteração no número de sequências UP ($F_{(1,8)} = 0,2110$; $p > 0,05$), e nas sequências DOWN ($F_{(1,8)} = 3,872$; $p > 0,05$) quando comparado ao controle na condição sem estresse (figura 30).

FIGURA 24 – Pressão arterial sistólica (PAS) de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 25 – Variabilidade total da pressão arterial sistólica (PAS) de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de

Fisher LSD.

FIGURA 26– Potência da banda de baixa frequência (LF) do espectro da pressão arterial sistólica (PAS) de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 27– (A) Intervalo de pulso (IP) e (B) Variabilidade total do intervalo de pulso de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 28 – (A) Potência da banda de baixa frequência (LF) (B) e alta frequência (HF) do espectro do intervalo de pulso de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p>0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 29 – (A) Potência da banda de baixa frequência (LF), (B) alta frequência (HF) em unidades normalizadas e (C) relação entre as potências LF e HF do espectro intervalo de pulso de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p>0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 30 – (A) Ganho total das sequências barorreflexas; (B) ganho das sequências UP e (C) ganho das sequências DOWN de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 31 – (A) Índice de efetividade do barorreflexo total (BEI), (B) BEI das sequências barorreflexas UP e (C) BEI de sequências barorreflexa DOWN de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p>0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

4.5) Dosagem de Corticosterona

A análise de two-way ANOVA indicou que o tratamento com cloreto de cobalto na dose de 1mM /250 nL não promoveu alteração na concentração de corticosterona, em função do tempo (tratamento: $F_{(1, 8)} = 0,06684$, $p > 0,05$; tempo: $F_{(3, 24)} = 2,503$, $p > 0,05$; interação: $F_{(3, 24)} = 0,2630$, $p > 0,05$), quando comparada ao controle quando os animais foram submetidos a condição sem estresse (figura 32).

FIGURA 32 – Concentração de corticosterona no plasma de animais em suas caixas (condição sem estresse) e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $P > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

5) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar sobre as respostas autonômicas (PA, FC, temperatura, variabilidade da frequência cardíaca e barorreflexo espontâneo) e neuroendócrinas ocasionadas pelo ER.

5.1) Pressão Arterial, Frequência Cardíaca e Temperatura Cutânea

A microinjeção de ACSF e cloreto de cobalto na dosagem 1 mM/250 nL não alterou os valores basais da PAM, FC e TC ($p < 0,05$), conforme representado na tabela 4.

Tabela 4 - Valores basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea (TC) antes e após a microinjeção de cloreto de cobalto (inibidor sináptico inespecífico) na região entre lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar.

Nmol/250nL	n	PAM				FC				TC			
		Antes±EPM (mmHg)	Após±EPM (mmHg)	t=	P=	Antes±EPM (bpm)	Após±EPM (bpm)	t=	P=	Antes±EPM (C°)	Após±EPM (C°)	t=	P=
Cobalto ER	5	106,3±0,7185	106,3±0,4730	1,9	0,990	321,3±2,040	324,4±1,511	1,1	0,264	32,36±0,1631	32,52±0,1085	2,6	0,0801
Veículo ER	5	107,3±0,7847	105,6±0,5677	1,7	0,116	327,3±1,237	333,1±6,759	0,9	0,383	32,06±0,2545	32,01±0,0475	0,1	0,8716

A análise de two-way ANOVA indicou que o tratamento com cloreto de cobalto na dose de 1 mM /250 nL potencializou a resposta pressora, em função do tempo (tratamento: $F_{(1,639)} = 69,71$, $p < 0,05$; tempo: $F_{(70,639)} = 3,790$, $p < 0,05$; interação: $F_{(70, 639)} = 0,7134$, $p > 0,05$) acompanhado de uma redução da resposta taquicárdica (tratamento: $F_{(1, 639)} = 28,13$, $p < 0,05$; tempo: $F_{(70, 639)} = 5,538$, $p < 0,05$; interação: $F_{(70, 639)} = 0,5505$, $p > 0,05$) e potencializou a queda da temperatura cutânea (tratamento: $F_{(1, 8)} = 4,189$, $p < 0,05$; tempo: $F_{(12, 96)} = 52,48$, $p < 0,05$; interação: $F_{(12, 96)} = 4,559$, $p > 0,05$) ocasionadas pela exposição aguda ao ER. Logo, o cloreto de cobalto na dosagem de 1 mM /250 nL foi suficiente para causar alterações nas respostas autonômicas induzidas pela situação aversiva presente ($p < 0,05$) (figura 33).

FIGURA 33 – Variação da pressão arterial média (ΔPAM), frequência cardíaca (ΔFC) e temperatura cutânea (ΔTC) ao longo do tempo de animais submetidos ao estresse de restrição e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL (esferas pretas, $n=5$) ou veículo ACSF (esferas brancas, $n=5$). No tempo de 0 min os animais foram submetidos ao estresse de restrição. Pontos representam as médias e as barras o EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

5.2) Variabilidade da Frequência Cardíaca (PAS e IP).

Em relação ao grupo submetido ao ER, a análise estatística (ANOVA two-way para medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Fisher LSD) demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar não apresentou alterações da PAS ($F_{(1, 8)} = 1,021$; $p > 0,05$), na variabilidade da PAS ($F_{(1, 8)} = 0,6293$; $p > 0,05$), além de não influenciar a potência da banda LF ($F_{(1, 8)} = 0,7577$; $p > 0,05$) quando comparado ao grupo controle durante o ER (figuras 34, 35 e 36).

No que se refere ao intervalo de pulso, a análise de variância de dois fatores (ANOVA two-way para medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Fisher LSD) demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar não causou alteração no IP ($F_{(1, 8)} = 0,02486$; $p > 0,05$;) e na variabilidade total ($F_{(1, 8)} = 0,2120$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle durante o ER (figura 37). Além disso, não foi possível observar alterações na potência da banda LF ($F_{(1, 8)} = 0,001847$; $p > 0,05$) e na potência da banda de HF ($F_{(1, 8)} = 0,4107$; $p > 0,05$) do IP em valores absolutos, quando comparado ao controle (figura 38).

Em relação à potência das bandas de LF e HF dentro do espectro do intervalo de pulso, descritas em unidades normalizadas, a análise de duas vias para medidas repetidas seguida do pós-teste de Fisher (ANOVA two-way) não demonstrou alteração significativa de LF ($F_{(1, 8)} = 0,5773$; $p > 0,05$) e HF ($F_{(1, 8)} = 0,6115$; $p > 0,05$), assim como a na razão das potências LF/HF ($F_{(1, 8)} = 0,9826$; $p > 0,05$), não havendo diferença significativa quando comparado com o grupo controle (figura 39).

5.3) Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo (BRS)

A análise de variância, two-way ANOVA para medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Fisher LSD indicou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar não causou alteração no ganho total ($F_{(1,10)} = 1,230$;

$p>0,05$) quando comparado ao grupo controle. Além disso, não houve alteração no número de sequências UP ($F_{(1,10)} = 1,336$; $p>0,05$) e no número de sequências DOWN ($F_{(1,10)} = 0,04754$; $p>0,05$) quando comparados ao controle (figura 40).

No que se refere ao índice de efetividade do barorreflexo, a análise estatística (two-way ANOVA para medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Fisher LSD) não demonstrou alteração no número de sequências barorreflexas relacionadas ao ganho total ($F_{(1,10)} = 0,2382$; $p>0,05$), sem variações nas sequências UP ($F_{(1,10)} = 2,177$; $p>0,05$) ou nas sequências DOWN ($F_{(1,10)} = 1,713$; $p>0,05$), quando comparado ao grupo controle (figura 41).

FIGURA 34 – Pressão arterial sistólica (PAS) de animais submetidos ao ER e pré tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle ($n=5$) e cobalto ($n=5$). $p>0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 35 – Variabilidade total da pressão arterial sistólica (PAS) de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle ($n=5$) e cobalto ($n=5$). $p>0,05$ comparado

ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 36 – Potência da banda de baixa frequência (LF) do espectro da pressão arterial sistólica (PAS) de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p>0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 37 – (A) Intervalo de pulso (IP) e (B) Variabilidade total do intervalo de pulso de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $*p<0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 38 – (A) Potência da banda de baixa frequência (LF) (B) e alta frequência (HF) do espectro do intervalo de pulso de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 39 – (A) Potência da banda de baixa frequência (LF), (B) alta frequência (HF) em unidades normalizadas e (C) relação entre as potências LF e HF do espectro intervalo de pulso de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 40 – (A) Ganho total das sequências barorreflexas; (B) ganho das sequências UP e (C) ganho das sequências DOWN de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

FIGURA 41 – (A) Índice de efetividade do barorreflexo total (BEI), (B) BEI das sequências barorreflexas UP e (C) BEI de sequências barorreflexa DOWN de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

5.5) Dosagem de Corticosterona

A análise de two-way ANOVA indicou que o tratamento com cloreto de cobalto na dose de 1mM /250 nL promoveu queda na concentração de corticosterona nos minutos 20, 40 e 60min de ER, em função do tempo (tratamento: $F_{(1, 10)} = 6,139$, $p < 0,05$; tempo: $F_{(3, 30)} = 21,59$, $p < 0,05$; interação: $F_{(3, 30)} = 0,9214$, $p < 0,05$), quando comparado ao controle durante o ER (figura 42).

FIGURA 42 – Concentração de corticosterona no plasma de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos controle (n=5) e cobalto (n=5). $P > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA two-way para medidas repetidas seguida por pós-teste de Fisher LSD.

6) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar sobre a resposta comportamental ocasionada pelo ER.

A análise de variância, one-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Duncan demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar não causou alteração significativa quando comparado ao controle na porcentagem de entradas nos braços abertos ($F_{(2,23)} = 1,092$; $p > 0,05$); nos braços fechados ($F_{(2, 24)} = 0,1136$; $p > 0,05$) e no tempo despendido nos braços abertos ($F_{(2,24)} = 1,200$; $p > 0,05$) quando

submetidos ao teste comportamental de LCE 24 h após estresse de restrição por 120 min (figura 43). Em relação ao teste comportamental de campo aberto, a análise estatística (one-way ANOVA seguida de pós teste de Duncan) indicou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) não promoveu alterações significativas em relação a distância percorrida dentro da arena ($F_{(2,25)} = 1,090$; $p > 0,05$), quando comparado ao controle (figura 44).

Em relação ao teste de transição claro-escuro, a análise de variância, one-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Duncan demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar promoveu uma diminuição significativa no tempo de transição do animal no compartimento iluminado ($F_{(2, 25)} = 5,727$; $p > 0,05$), quando comparado com controle (figura 45).

FIGURA 43 – (A) Porcentagem de entradas nos braços fechados; (B) porcentagem de entradas nos braços abertos e (C) tempo gasto nos braços abertos de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL antes de 120 min de ER e submetidos 24 h após ao LCE. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos *naïve* (n=9), veículo (n=9) e cobalto (n=10). O grupo não exposto ao estresse (*naïve*) e o grupo não-tratado (veículo) foram utilizados como controle. $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA one-way, pós-teste de Duncan

FIGURA 44 – Distância percorrida na arena de animais pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1mM/250nL antes de 120 minutos de ER e submetidos 24 horas após ao campo aberto. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos *naïve* (n=9), veículo (n=9) e cobalto (n=10). O grupo não exposto ao estresse (*naïve*) e o grupo não-tratado (veículo) foram utilizados como controle. $p>0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA one-way, pós-teste de Duncan.

FIGURA 45 – Porcentagem do tempo de transição no comportamento iluminado de animais pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL antes de 120 min de ER e submetidos 24 horas após ao claro-escuro. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos *naïve* (n=9), veículo (n=9) e cobalto (n=10). O grupo não exposto ao estresse (*naïve*) e o grupo não-tratado (veículo) foram utilizados como controle. $p>0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA one-way, pós-teste de Duncan

7) Efeito da administração de cloreto de cobalto (bloqueador sináptico) entre os lóbulos VI-V do vermis anterior cerebelar sobre a resposta comportamental ocasionada pelo ER.

A análise de variância, one-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Duncan demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) na região entre os lóbulos IV-V do vermis

anterior cerebelar não causou alteração significativa quando comparado ao controle na porcentagem de entradas nos braços abertos ($F_{(2, 21)} = 1,470$; $p > 0,05$), nos braços fechados ($F_{(2,22)} = 0,09850$; $p > 0,05$) e no tempo despendido nos braços abertos ($F_{(2,19)} = 3,398$; $p > 0,05$) durante o teste comportamental de LCE 24 h após estresse de restrição por 120 min (figura 46). Em relação ao teste comportamental do campo aberto, a análise estatística (one-way ANOVA seguida de pós teste de Dunkan) o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) não promoveu alterações significativas em relação a distância percorrida dentro da arena ($F_{(2, 20)} = 2,066$; $p > 0,05$); quando comparado ao controle (figura 47).

No que se refere ao teste de transição claro-escuro, a análise de variância, one-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Dunkan demonstrou que o tratamento com cloreto de cobalto (1 mM/250 nL) na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar não causou alteração significativa quando comparado ao controle na porcentagem tempo de transição no compartimento iluminado ($F_{(2, 20)} = 3,180$; $p > 0,05$), quando comparado ao controle (figura 48)

FIGURA 46 – (A) Porcentagem de entradas nos braços fechados; (B) porcentagem de entradas nos braços abertos e (C) tempo gasto nos braços abertos de animais submetidos ao ER e pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL antes de 120 min de ER e submetidos 24 h após ao LCE. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos naive (n=8), veículo (n=8) e cobalto (n=8). O grupo não exposto ao estresse (naive) e o grupo não-tratado (veículo) foram utilizados como controle. $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA one-way, pós-teste de Dunkan.

FIGURA 47 – (A) Distância percorrida na arena de animais pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL antes de 120 min de ER e submetidos 24 horas após no campo aberto. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos *naïve* (n=8), veículo (n=8) e cobalto (n=8). O grupo não exposto ao estresse (*naïve*) e o grupo não-tratado (veículo) foram utilizados como controle. $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA one-way, pós-teste de Duncan.

FIGURA 48 – (A) Distância percorrida na arena de animais pré-tratados na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar com cloreto de cobalto 1 mM/250 nL antes de 120 min de ER e submetidos 24 horas após no campo aberto. As colunas representam média $\pm$ EPM entre os grupos *naïve* (n=8), veículo (n=8) e cobalto (n=8). O grupo não exposto ao estresse (*naïve*) e o grupo não-tratado (veículo) foram utilizados como controle. $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA one-way, pós-teste de Duncan.

Discussão

DISCUSSÃO

O presente trabalho é o primeiro estudo a analisar a participação do vermis cerebelar nas respostas autonômicas e comportamentais associadas ao ER. Nossos achados demonstraram que as regiões entre os lóbulos II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar são capazes de influenciar as respostas cardiovasculares evocadas pelo ER. A microinjeção de cloreto de cobalto, um inibidor sináptico inespecífico, na região entre os lóbulos II-III potencializou a resposta pressora e taquicárdica durante o ER. Dessa forma, nossos dados sugerem que a região entre os lóbulos II-III atue exercendo uma influência inibitória sobre as respostas, pressora e taquicárdica, ocasionadas pelo ER. Além disso, o pré-tratamento com cobalto na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar inibiu a queda na temperatura cutânea da cauda ocasionada pelo ER, sugerindo assim que a região atue modulando o tônus simpático na artéria da cauda, elevado em situações aversivas como o ER.

Em adição, a microinjeção de cobalto na região entre os lóbulos IV-V também foi capaz de potencializar a resposta pressora; entretanto, causou redução na resposta taquicárdica ocasionada pelo ER. Portanto, a região entre os lóbulos IV-V atuaria mediante influência inibitória da resposta pressora e ação facilitatória da resposta taquicárdica promovida pelo ER. Em relação aos achados da temperatura cutânea, foi observado que o pré-tratamento com cobalto na região entre os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar potencializou a queda na temperatura cutânea ocasionada pelo ER, sugerindo assim que a região exerça influência inibitória sobre a vasoconstrição cutânea observada durante o ER. As respostas autonômicas opostas observadas nas regiões investigadas corroboram com estudos de nosso grupo que evidenciaram que diferentes subnúcleos de uma região do SNC, como o córtex pré-límbico e o infra-límbico, por

exemplo, modulariam respostas autonômicas opostas durante a exposição do animal ao ER (TAVARES; CORRÊA; RESSTEL, 2009).

Corroborando com nossos achados, diferentes estudos evidenciaram uma elevação de pressão arterial e frequência cardíaca a partir de uma estimulação elétrica no vermis anterior (lóbulos I, II, III e IV), no vermis posterior (lóbulos IX-X) e no córtex cerebelar (LISANDER, 1971; NISIMARU, 2004; NISIMARU; KATAYAMA, 1995; NISIMARU; YAMAMOTO; SHIMOYAMA, 1984; RAMU; BERGMANN, 1967). Em adição, foi evidenciado que a região cerebelar caracterizada como núcleo fastígio também é capaz de promover resposta pressora e taquicárdica quando estimulada eletricamente (GHELARDUCCI; SEBASTIANI, 1996). Entretanto, respostas opostas também foram relatadas após a estimulação elétrica nos lóbulos I, II, III, VII e VII do vermis cerebelar, onde causaram queda na pressão arterial e redução da atividade do nervo simpático renal (NISIMARU; YAMAMOTO; SHIMOYAMA, 1984; SADAKANE; KONDO; NISIMARU, 2000), assim como queda na frequência cardíaca (RAMU; BERGMANN, 1967).

Dessa forma, os presentes achados demonstram a participação das regiões entre os lóbulos II-III e IV-V no controle das respostas cardiovasculares evocadas pelo ER, sugerindo a participação da região do vermis do cerebelo na modulação de respostas autonômicas ao estresse. Recentemente, foi relatado que a microinjeção de adrenomedulina, um neuropeptídeo hipotensor, no vermis anterior cerebelar de ratos normotensos e hipertensos foi capaz de ocasionar redução da resposta pressora em ambos os grupos, em situação de estresse agudo por choque nas patas, evidenciando o efeito neuromodulador do cerebelo sobre as respostas cardiovasculares ocasionadas pelo estresse (FIGUEIRA; ISRAEL, 2017).

Além disso, um padrão de elevação de pressão arterial e frequência cardíaca foi observado após estimulação com eletrodos no vermis posterior cerebelar em animais não-anestesiados, sendo que os autores sugeriram a participação da atividade simpática

na região (BRADLEY et al., 1987). Dessa forma, os dados do presente estudo são capazes de reforçar a idéia da participação da região entre os lóbulos II-III e IV-V do cerebelo na modulação cardiovascular. Todavia, são poucos os achados nas áreas estudadas para que haja uma adequada compreensão dos mecanismos ativados em situações aversivas como o ER.

Em contrapartida, o pré-tratamento com cloreto de cobalto na região entre os lóbulos II-III e entre os lóbulos IV-V não causou alterações cardiovasculares quando não havia submissão do animal a uma condição de ER, desta forma não afetando respostas autonômicas basais. Deste modo, os achados na região entre os lóbulos II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar sugerem que estas regiões não atuem de forma tônica sobre o controle da pressão basal, ou seja, por si só não modulariam o tônus cardiovascular, sendo dependentes de um estímulo, como o ER para serem ativadas. Além disso, na condição sem estresse a temperatura da cauda também não foi afetada pelo pré-tratamento com cloreto de cobalto na região entre os lóbulos II-III e entre os lóbulos IV-V.

O ER é caracterizado como um modelo estresse principalmente psicológico capaz de promover respostas autonômicas, como elevação da pressão arterial, elevação da frequência cardíaca e queda na temperatura cutânea, além de ser bem estabelecido na literatura como um estímulo aversivo e inequívoco (BARRON; VAN LOON, 1989; BUSNARDO; TAVARES; CORREA, 2014; CRESTANI et al., 2010; IRVINE; WHITE; CHAN, 1998; TAVARES; CORRÊA, 2006). Em adição, foi demonstrado que a resposta pressora e taquicárdica ocasionada pelo estresse é resultante de ativação simpática nos vasos e tanto por estimulação simpática cardíaca quanto da parassimpática cardíaca, respectivamente (BAUDRIE et al., 1997; CARRIVE, 2006). Sabe-se que estruturas suprabulbares como o hipotálamo, amígdala e regiões específicas do córtex cerebral estão envolvidas na modulação das respostas autonômicas promovidas pelo ER, podendo inibir ou facilitar respostas autonômicas simpato-vagais (BUSNARDO et al.,

2010; CRESTANI et al., 2009; FASSINI et al., 2017; FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009; REIS et al., 2011; TAVARES; CORRÊA, 2006; TAVARES; PELOSI; CORRÊA, 2009).

As respostas cardiovasculares observadas no presente estudo indicam a existência de conexões funcionais do cerebelo com estruturas do SNC capazes de influenciar as respostas autonômicas, tais como visto em estudos anteriores que relatam a existência de projeções do cerebelo para regiões como a amígdala e o córtex cerebral (SCHMAHMANN; PANDYA, 1995b; SNIDER; MAITI, 1976), regiões essas que estão envolvidas na modulação de respostas autonômicas ocasionadas por situações de estresse (FENDT; FANSELOW, 1999; FORTALEZA; TAVARES; CORRÊA, 2009; IWATA et al., 1986; TAVARES; CORRÊA, 2006). Além disso, foi evidenciada, através de estudos neuroanatômicos, a existência de projeções cerebelares para regiões do hipotálamo, em particular para o núcleo paraventricular (PVN) (BANGMA; DONKELAAR, 1982; DIETRICH; HAINES, 1986; DIETRICH; WIKLUND; HAINES, 1992; HAINES; SOWA; DIETRICH, 1985), estrutura que desempenha papel fundamental no controle das respostas autonômicas induzidas pelo estresse (BUSNARDO et al., 2010, 2013; BUSNARDO; TAVARES; CORREA, 2014). Do mesmo modo, foi evidenciada a necessidade de manutenção da integridade da conexão hipotalâmica-cerebelar, já que a perda da conexão entre ambos é capaz de eliminar as respostas autonômicas envolvendo o cerebelo (SAWYER; HILLIARD; BAN, 2017).

O próximo passo no presente estudo foi investigar a participação da região entre os lóbulos II-III e os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar no controle da variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Evidenciamos que o pré-tratamento com cloreto de cobalto na região entre os lóbulos II-III não ocasionou alterações significativas nos parâmetros analisados, tanto na condição sem estresse quanto durante ER. Já em relação a região dos lóbulos IV-V, o pré-tratamento com cloreto de cobalto não promoveu alterações na

VFC durante o ER; entretanto, afetou a potência da banda de baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica (PAS) na condição sem estresse, sugerindo que a área exerceria influencia inibitória sobre a atividade simpática vascular. Sabe-se que as oscilações de baixa frequência (LF) são intermediadas, sobretudo, pelo sistema nervoso simpático (LEGRAMANTE et al., 2009; MALIK; CAMM, 1993). Entretanto, a elevação observada da potência LF da PAS não foi suficiente para promover alteração nos parâmetros cardiovasculares, PA e FC, na condição observada sem estresse.

A investigação da VFC, assim como a análise da atividade barorreflexa se caracterizam como importantes ferramentas para o estudo da modulação neural da atividade cardíaca (AKSELROD et al., 1981; BERTINIERI et al., 1985). Sendo assim, além da análise da VFC, foi investigada a atividade barorreflexa espontânea relacionada às regiões entre os lóbulos II-III e os lóbulos IV-V do vermis anterior cerebelar.

Em relação ao barorreflexo espontâneo, os achados evidenciaram que pré-tratamento com cloreto de cobalto, da região entre os lóbulos II-III, foi capaz de promover um aumento no ganho das sequências totais e nas sequências UP tanto na condição sem estresse quanto durante o ER, sugerindo atividade reflexa da área e uma modulação parassimpática. O método das sequências que utilizamos, permite a avaliação das respostas cardiovasculares de forma reflexa, ocasionadas por alterações espontâneas da pressão arterial, analisando-as através do domínio do tempo (BERTINIERI et al., 1985, 1988; DI RIENZO et al., 2001; PARATI et al., 1994; RIENZO; MILANO, 1985). Assim, é possível correlacionar aumentos progressivos de PA e de intervalos cardíacos, caracterizados pelas sequências UP que evidenciam a modulação do tônus vagal (RIENZO; MILANO, 1985).

Em situação de estresse, diversas estruturas do SNC são capazes de modular a atividade barorreflexa cardíaca, sendo que estudos anteriores evidenciaram que as respostas autonômicas moduladas pelas regiões límbicas, como o hipotálamo, podem ser

inibidas ou estimuladas mediante ação do barorreflexo (BAUER et al., 1988; SIMON et al., 1985). Achados da literatura evidenciaram que o cerebelo, através da conexão com o hipotálamo, promove o controle de reflexos vasomotores e da pressão arterial, além dos reflexos no seio carotídeo, quando estimulado eletricamente (GRITTI, 2013). Em adição, estudos de rastreamento anterógrado relataram uma projeção da região da úvula, lóbulo IX em roedores, para os núcleos parabraquiais, regiões conhecidas por inervarem o núcleo do trato solitário (NTS) e o bulbo ventrolateral rostral (RVLM)(GHELARDUCCI; SEBASTIANI, 1996; PATON; SPYER, 1990). Sabe-se que ambas as estruturas, NTS e o RVLM, estão relacionados na ativação de barorreceptores mediante alterações na pressão arterial (Dampney, 1994), sugerindo uma relação entre atividade barorreflexa e o cerebelo.

Além disso, foi evidenciada que a estimulação no lóbulo IX promove aumento do ganho do reflexo barorreceptor durante o exercício (Paton and Spyer, 1990; Paton et al., 1990), situação na qual ocasiona ativação do sistema nervoso simpático assim como o ER, corroborando com nossos achados. Diante disso, uma vez que o cerebelo apresenta projeções diretas e indiretas para regiões como hipotálamo, córtex e amígdala (Bangma and Donkelaar, 1982; Haines et al.,; Dietrichs and Haines, 1986; Paton and Spyer, 1990; Dietrichs et al., 1992), poder-se-ia explicar as alterações cardiovasculares observadas.

Entretanto, foi demonstrado que a ativação dos barorreceptores arteriais durante a estimulação do lóbulo IX de coelhos e gatos não anestesiados não promoveu alterações reflexas na frequência cardíaca e na pressão arterial (NISIMARU; KATAYAMA, 1995), assim como foi observado após o pré-tratamento com cloreto de cobalto na região entre os lobos IV-V, onde não evidenciamos alterações na atividade barorreflexa durante o ER. Diante disso, é possível correlacionar a potencialização das respostas pressora e taquicárdica ocasionada pelo ER na região entre os lobos II-III com os achados da atividade barorreflexa, sugerindo que durante o bloqueio sináptico da área mediante ao

ER, a atividade barorreflexa esteja presente atuando a todo o momento, entretanto ainda se faz necessário uma maior investigação para evidenciar as principais vias envolvidas.

Além das respostas autonômicas, o ER é capaz de promover a liberação de corticosterona (em roedores) na corrente sanguínea através da estimulação do eixo HPA. Com isso, outro objetivo do nosso estudo foi avaliar o envolvimento das áreas cerebelares (regiões entre os lóbs II-III e IV-V) na modulação da resposta neuroendócrina ocasionada pelo ER.

Foi observado que o tratamento com cloreto de cobalto na região entre os lóbulos II-III do vermis anterior cerebelar promoveu aumentos significativos aos níveis plasmáticos de corticosterona durante o ER, sugerindo um papel facilitador da área na liberação hormonal da corticosterona durante o ER. Em relação a região entre os lóbulos IV-V, a inibição cloreto de cobalto promoveu uma redução significativa aos níveis plasmáticos de corticosterona quando comparado ao controle durante o ER, sustentando a ideia que área participe do eixo HPA. O achado se assemelha a observação feita por Busnardo et al (2010) e Lopez-Avezado et al (2019) após a inibição com cloreto de cobalto no PVN e SON, respectivamente.

Em adição, foi investigada a participação do cerebelo nas respostas comportamentais caracterizadas pelo efeito ansiogênico ocasionado pelo ER. No presente estudo, nas regiões entre os lóbulos II-III e IV-V, o ER diminuiu a exploração dos braços abertos no labirinto de cruz elevado (LCE), caracterizado como efeito ansiogênico observado quando os grupos controle (*naïve* e veículo) foram submetidos ao teste LCE 24 h após o ER. A resposta comportamental observada no LCE corrobora com o que é descrito na literatura, que o ER é capaz de promover efeito ansiogênico tardio (BUSNARDO et al., 2013; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000). Além disso, os achados demonstraram que o pré-tratamento com cloreto de cobalto nas regiões entre os lóbulos II-III e IV-V não alterou a porcentagem de entradas nos braços fechados e abertos, além

de não interferir no tempo do animal nos braços abertos, sugerindo que a área não atua evitando as consequências comportamentais da exposição ao ER.

Há poucas evidências na literatura que demonstram a participação do vermis cerebelar atuando sobre respostas comportamentais; entretanto, um estudo demonstrou que lesões na região do vermis promovia uma diminuição da tigmotáxia no teste de campo aberto (SUPPLE; LEATON; FANSELOW, 1987), sugerindo uma possível participação do cerebelo em respostas comportamentais. Entretanto, no presente estudo, o pré-tratamento com cloreto de cobalto nas regiões entre os lóbulos II-III e IV-V não promoveu alterações nos parâmetros analisados no teste de campo aberto, como a distância total percorrida, sugerindo que área não exerce influência sobre as alterações comportamentais exploratórias após ER, além de demonstrar que a atividade locomotora do animal não foi prejudicada, visto que este parâmetro é utilizado como índice da atividade locomotora em roedores (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994).

No que se fez respeito ao teste de transição claro-escuro, modelo comportamental capaz de evidenciar ansiedade mediante dois ambientes, um aversivo relacionado com o ambiente iluminado e outro não-aversivo, o campo escuro (CRAWLEY; GOODWIN, 1980). o pré-tratamento com cloreto de cobalto na região entre os lóbulos II-III promoveu alterações significativas quando comparado ao controle (*naïve*), sugerindo assim que a área atua controlando as alterações comportamentais ocasionadas pelo ER, visto que sua retirada potencializa o efeito ansiogênico, mantendo o animal menos tempo no ambiente aversivo (compartimento iluminado). Em adição, a inibição com cloreto de cobalto na região entre os lóbulos IV-V não apresentou alterações estatísticas significativas, apenas uma tendência a potencialização do efeito ansiogênico, assim como observado na área II-III. Todavia, sugere-se que as regiões estudadas podem estar envolvidas nas respostas comportamentais, sendo fundamental maiores investigações comportamentais para melhor compreensão dos achados.

Considerando os resultados obtidos até o presente momento, é possível evidenciar a participação das áreas cerebelares na modulação das respostas autonômicas, neuroendócrina e comportamental mediante ao ER. Em adição, o presente estudo foi primeiro passo a ser realizado para investigação das áreas para posteriormente uma análise de possíveis neurotransmissões existentes nas regiões estudadas. É importante ressaltar que estudo foi um dos primeiros a ressaltar a participação cerebelar nas respostas autonômicas, como PA, FC, TC, barorreflexo espontâneo e VFC, além dos achados da resposta neuroendócrina e comportamental, corroborando assim com os objetivos propostos inicialmente em nosso trabalho.

Conclusão

CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo indicam que as regiões entre os lóbulos II-III e IV-V do vermis anterior cerebelar atuam modulando parâmetros autonômicos, como a PA, FC e TC, e neuroendócrina (níveis plasmáticos de corticosterona) durante o ER, porém exercem papel tônico sobre a regulação cardiovascular em condições de repouso sem estresse. Nossos resultados referentes à atividade barorreflexa espontânea, tanto na condição sem estresse quanto durante o ER, sugerem que a inibição da II-III por cloreto de cobalto indica que a mesma exerça uma influência inibitória sobre a modulação parassimpática cardíaca, enquanto a inibição dos IV-V não afeta atividade barorreflexa espontânea. Entretanto, não foi observada alteração significativa em ambas as áreas investigadas no que se refere à VFC. Em relação à análise comportamental, em geral, os resultados indicam que as regiões entre os lóbulos II-III e IV-V possivelmente não modulem as comportamentais ocasionadas pelo ER.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSELROD, S. et al. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. v. 213, n. July, p. 220–222, 1981.
- APPS, R.; HAWKES, R. Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 670–81, set. 2009.
- BANGMA, G. C.; DONKELAAR, H. J. T. E. N. Afferent Connections of the Cerebellum in Various Types of Rep tiles. **The Journal Of Comparative Neurology**, v. 273, p. 255–273, 1982.
- BARRON, B. A.; VAN LOON, G. R. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 28, n. 2, p. 179–87, nov. 1989.
- BAUDRIE, V. et al. Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 17, n. 5, p. 303–309, 1997.
- BAUER, R. M. et al. A GABAergic mechanism in the posterior hypothalamus modulates baroreflex bradycardia. **Brain Research Bulletin**, v. 20, n. 5, p. 633–641, 1988.
- BERTINIERI, G. et al. A new approach to analysis of the arterial baroreflex. **J Hypertens Suppl.**, v. Dec;3(3):S, 1985.
- BERTINIERI, G. et al. Evaluation of baroreceptor reflex by blood pressure monitoring in unanesthetized cats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 255, n. 6, p. 1–1, 1988.
- BING, X. et al. Alterations in the cortical thickness and the amplitude of low-frequency fluctuation in patients with post-traumatic stress disorder. **Brain research**, v. 1490, p. 225–32, 15 jan. 2013.
- BRADLEY, D. et al. Cardiovascular and respiratory responses evoked from the posterior cerebellar cortex and fastigial nucleus in the cat. **Journal of physiology**, p. 107–121, 1987.
- BUSNARDO, C. et al. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 158, n. 1–2, p. 51–57, 2010.
- BUSNARDO, C. et al. Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 11, p. 1611–1622, 2013.
- BUSNARDO, C.; TAVARES, R. F.; CORREA, F. M. A. Angiotensinergic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates the pressor response to acute restraint stress in rats. **Neuroscience**, v. 270, p. 12–9, 13 jun. 2014.
- CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior : The elevated plus-maze model 20 years on. v. 29, p. 1193–1205, 2005.
- CARRIVE, P. Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 12, p. 1251–1254, 2006.
- CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167–170, 1980.
- CRESTANI, C. C. et al. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress**, v. 12, n. 3, p. 268–278, 2009.
- CRESTANI, C. C. et al. Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 13, n. 1, p. 61–72, jan. 2010.
- CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171–176, 1994.
- DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 2, p. 323–364, 1994.
- DELGADO-GARCÍA, J. M. Structure and function of the cerebellum. **Revista de neurologia**, v. 33, n. 7, p. 635–42, 2001.
- DEOLINDO, M. V. et al. NMDA receptors in the lateral hypothalamus have an inhibitory influence on the tachycardiac response to acute restraint stress in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 3, p. 2374–2381, 2013.

- DI RIENZO, M. et al. Baroreflex effectiveness index: an additional measure of baroreflex control of heart rate in daily life. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 3, p. R744–R751, 2001.
- DIETRICH, E.; HAINES, D. E. Do the same hypothalamic neurons project to both amygdala and cerebellum? **Brain Research**, v. 364, n. 2, p. 241–248, 1986.
- DIETRICH, E.; WIKLUND, L.; HAINES, D. E. The hypothalamo-cerebellar projection in the rat: origin and transmitter. **Arch Ital Biol.**, p. 203– 11., 1992.
- DOS REIS, D. G. et al. Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 17, n. 4, p. 362–72, jul. 2014.
- DUARTE, J. O.; PLANETA, C. S.; CRESTANI, C. C. Immediate and long-term effects of psychological stress during adolescence in cardiovascular function : Comparison of homotypic vs heterotypic stress regimens. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 40, p. 52–59, 2015.
- ENGELHARDT, E.; MOREIRA, D. M. O cerebelo e suas principais conexões: estudo com tensor de difusão. **Rev. bras. neurol**, v. 45, n. 3, p. 17–27, 2009.
- ETKIN, A. et al. Disrupted amygdalar subregion functional connectivity and evidence of a compensatory network in generalized anxiety disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 66, n. 12, p. 1361–1372, 2009.
- FASSINI, A. et al. The medial preoptic area modulates autonomic function under resting and stress conditions. **Neuroscience**, v. 364, n. September, p. 164–174, 2017.
- FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. v. 23, p. 743–760, 1999.
- FIGUEIRA, L.; ISRAEL, A. Involvement of Cerebellar Adrenomedullin in Cardiovascular Regulation and Vasopressor Response to Acute Stress. **Journal of Cardiovascular Disorders**, p. 1–7, 2017.
- FORTALEZA, E. A. T.; TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A. The medial amygdaloid nucleus modulates cardiovascular responses to acute restraint in rats. **Neuroscience**, v. 159, n. 2, p. 717–726, 2009.
- GHELARDUCCI, B.; SEBASTIANI, L. Contribution of the cerebellar vermis to cardiovascular control. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 56, n. 3, p. 149–156, 1996.
- GRITTI, I. The cerebellum, the hypothalamus and behavior. **Natural Science**, v. 05, n. 07, p. 832–834, 2013.
- GUEST, F. L. et al. The effects of stress on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function in subjects with schizophrenia. **Rev Psiquiatr**, v. 40, n. 1, p. 20–7, 2013.
- HAIBARA, A. S.; SANTOS, R. A. S. Descobrimiento e importância dos barorreceptores. **Rev Bras Hipertens**, v. 7, p. 113–115, 2000.
- HAINES, D. ; SOWA, T. E.; DIETRICH, E. Connections between the cerebellum and hypothalamus in the tree shrew (*Tupaia glis*). **Brain Research**, v. 328, p. 367–373, 1985.
- IRVINE, R. J.; WHITE, J.; CHAN, R. The Influence of Restraint on Blood Pressure in the Rat. v. 162, n. 1997, 1998.
- IWATA, J. et al. Intrinsic Neurons in the Amygdaloid Field Projected to by the Medial Geniculate Body Mediate Emotional Responses Conditioned to Acoustic Stimuli. v. 383, p. 195–214, 1986.
- JORDAN, D. Central nervous integration of cardiovascular regulation. In: **Cardiovascular Regulation**. London: Portland Press, 1995. p. 1–14.
- KE, J. et al. A longitudinal fMRI investigation in acute post-traumatic stress disorder (PTSD). **Acta radiologica (Stockholm, Sweden : 1987)**, v. 57, n. 11, p. 1387–1395, nov. 2016.
- KIM, K. . et al. The effect of missing RR-interval data on heart rate variability analysis in the frequency domain. **Physiol Meas.**, p. 1039–50, 2009.
- KONISHI, J. et al. Multiple white matter volume reductions in patients with panic disorder: relationships between orbitofrontal Gyrus volume and symptom severity and social dysfunction. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92862, 2014.
- KRETZ, R. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. **Journal of neuroscience methods**, v. 11, n. 2, p. 129–35, jun. 1984.
- LAWRENSON, C. et al. The mystery of the cerebellum: clues from experimental and clinical observations. **Cerebellum & Ataxias**, v. 5, n. 8, p. 1–11, 2018.
- LEGRAMANTE, J. M. et al. Investigating feedforward neural regulation of circulation from analysis of spontaneous arterial pressure and heart rate fluctuations in conscious rats. **American Journal**

- of **Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 296, n. 1, p. H202–H210, 2009.
- LISANDER, B. Cerebellar Suppression of the Autonomic Components of the Defence Reaction. p. 84–95, 1971.
- LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 321–340, 1990.
- LONG, N. C.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. Stress-induced rise of body temperature in rats is the same in warm and cool environments. **Physiology and Behavior**, v. 47, n. 4, p. 773–775, 1990.
- MALIK, M.; CAMM, A. J. Components of heart rate variability - what they really mean and what we really measure. **The American Journal of Cardiology**, v. 72, n. 11, p. 821–822, 1993.
- MARGIS, R. et al. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 25, n. suppl 1, p. 65–74, 2003.
- MCDUGALL, S. J. et al. Restraint stress : differential cardiovascular responses in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 35, n. 1 Pt 1, p. 126–9, jan. 2000.
- MORENO-RIUS, J. The cerebellum in fear and anxiety-related disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 85, n. December 2017, p. 23–32, 2018.
- MORUZZI. Paleocerebellar inhibition of vasomotor and respiratory carotid sinus reflexes. **Journal of Neurophysiology**, 1940.
- NICOLAIDES, N. C. et al. Stress, the Stress System and the Role of Glucocorticoids. **Neuroimmunomodulation**, v. 22, n. 1–2, p. 6–19, 2015.
- NISIMARU, N. Cardiovascular modules in the cerebellum. **The Japanese journal of physiology**, v. 54, n. 5, p. 431–48, out. 2004.
- NISIMARU, N.; KATAYAMA, S. Projection of cardiovascular afferents to the lateral nodulus-uvula of the cerebellum in rabbits. **Neuroscience research**, v. 21, n. 4, p. 343–50, fev. 1995.
- NISIMARU, N.; YAMAMOTO, M.; SHIMOYAMA, I. Inhibitory effects of cerebellar cortical stimulation on sympathetic nerve activity in rabbits. **The Japanese journal of physiology**, v. 34, n. 3, p. 539–51, 1984.
- NOLLO, G. et al. Exploring directionality in spontaneous heart period and systolic pressure variability interactions in humans : implications in the evaluation of baroreflex gain. 2005.
- OLIVEIRA JÚNIOR, E. . **Atenuação da modulação vagal com o envelhecimento: análise da variabilidade de frequência cardíaca, sensibilidade do barorreflexo e arritmia sinusal respiratória**. [s.l: s.n.].
- PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 1, p. 79–83, 2000.
- PAGANI, M. et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. **Circulation Research**, v. 59, n. 2, p. 178–193, 1986.
- PARATI, G. et al. Beta-adrenergic blocking treatment and 24-hour baroreflex sensitivity in essential hypertensive patients. **Hypertension**, v. 23, n. 6_pt_2, p. 992–996, 1994.
- PATON, J. et al. Inhibition of barosensitive neurones evoked. p. 553–565, 1990.
- PATON, J. F.; SPYER, K. M. Brain stem regions mediating the cardiovascular responses elicited from the posterior cerebellar cortex in the rabbit. **The Journal of Physiology**, v. 427, n. 1, p. 533–552, 1990.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Sidney, Australia: Academic Press, 1997.
- PELLOW, S. et al. Validation of open " closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. v. 14, p. 149–167, 1985.
- RAMOS, A. et al. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 85, n. 1, p. 57–69, 1997.
- RAMU, A.; BERGMANN, F. The Role of the Cerebellum in Blood Pressure Regulation. **Experientia**, v. 662, n. 1963, p. 1965–1966, 1967.
- REIS, D.; CUENOD, M. Central neural regulation of carotid baroreceptor reflexes in the cat. **American Physiological Society**, v. Volume 209, n. 6, p. 1267–1277, 1965.
- REIS, D. G. et al. Behavioral and autonomic responses to acute restraint stress are segregated within the lateral septal area of rats. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- RESSTEL, L. B. M.; FERNANDES, K. B. P.; CORRÊA, F. M. A. Medial prefrontal cortex

- modulation of the baroreflex parasympathetic component in the rat. **Brain research**, v. 1015, n. 1–2, p. 136–44, 23 jul. 2004.
- RIENZO, M. DI; MILANO, P. Volume and BIOLOGICAL VII International Conference on. n. November 2018, 1985.
- RINCON, A. I. . et al. The impact of artifact correction methods of RR series on heart rate variability parameters . **J Appl Physiol**, 2017.
- SACCHETTI, B.; SACCO, T.; STRATA, P. Reversible inactivation of amygdala and cerebellum but not perirhinal cortex impairs reactivated fear memories. **The European journal of neuroscience**, v. 25, n. 9, p. 2875–84, maio 2007.
- SADAKANE, K.; KONDO, M.; NISIMARU, N. Direct projection from the cardiovascular control region of the cerebellar cortex, the lateral nodulus-uvula, to the brainstem in rabbits. **Neuroscience Research**, v. 36, n. 1, p. 15–26, 2000.
- SANG, L. et al. Resting-state functional connectivity of the vermal and hemispheric subregions of the cerebellum with both the cerebral cortical networks and subcortical structures. **NeuroImage**, v. 61, n. 4, p. 1213–25, 16 jul. 2012.
- SAWYER, C. H.; HILLIARD, J.; BAN, T. Autonomic and EEG responses to cerebellar stimulation in rabbits. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 200, n. 3, p. 405–412, 2017.
- SCHMAHMANN, J. D.; PANDYA, D. N. Prefrontal cortex projections to the basilar pons in rhesus monkey: implications for the cerebellar contribution to higher function. **Neuroscience Letters**, v. 199, n. 3, p. 175–178, 1995a.
- SCHMAHMANN, J. D.; PANDYA, D. N. Prefrontal cortex projections to the basilar pons in rhesus monkey: implications for the cerebellar contribution to higher function. **Neuroscience letters**, v. 199, n. 3, p. 175–8, 27 out. 1995b.
- SIMON, O. et al. Interaction between the baroreflex and anterior hypothalamic stimulation. Demonstration of a noradrenergic involvement. **Neuropharmacology**, v. Jul;24(7, p. 665– 75., 1985.
- SNIDER, R. S.; MAITI, A. Cerebellar contributions to the Papez circuit. **Journal of neuroscience research**, v. 2, n. 2, p. 133–46, 1976.
- STOODLEY, C. J.; SCHMAHMANN, J. D. Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. **Cortex**, v. 46, n. 7, p. 831–844, 2010.
- STOODLEY, C. J.; VALERA, E. M.; SCHMAHMANN, J. D. Functional topography of the cerebellum for motor and cognitive tasks: an fMRI study. **NeuroImage**, v. 59, n. 2, p. 1560–70, 16 jan. 2012.
- SUPPLE, W. F.; LEATON, R. N. Cerebellar vermis: essential for classically conditioned bradycardia in the rat. **Brain research**, v. 509, n. 1, p. 17–23, 12 fev. 1990a.
- SUPPLE, W. F.; LEATON, R. N. Lesions of the cerebellar vermis and cerebellar hemispheres: effects on heart rate conditioning in rats. **Behavioral neuroscience**, v. 104, n. 6, p. 934–47, dez. 1990b.
- SUPPLE, W. F.; LEATON, R. N.; FANSELOW, M. S. Effects of cerebellar vermal lesions on species-specific fear responses, neophobia, and taste-aversion learning in rats. **Physiology and Behavior**, v. 39, n. 5, p. 579–586, 1987.
- TALATI, A. et al. Gray matter abnormalities in social anxiety disorder: Primary, replication, and specificity studies. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 1, p. 75–84, 2013.
- TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A. Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. **Neuroscience**, v. 143, n. 1, p. 231–40, 17 nov. 2006.
- TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A.; RESSEL, L. B. M. Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 11, p. 2601–2607, 2009.
- TAVARES, R. F.; PELOSI, G. G.; CORRÊA, F. M. A. The paraventricular nucleus of the hypothalamus is involved in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress**, v. 12, n. 2, p. 178–185, 2009.
- WICHTERLE, D. A. . et al. Cross-Spectral Analysis of Heart Rate and Blood Pressure Modulations. **Pacing Clin Electrophysiol**, v. 23, 2000.
- WILLIAMS, J. L.; ROBINSON, P. J.; LUTHERER, L. O. Inhibitory effects of cerebellar lesions on respiration in the spontaneously breathing, anesthetized cat. **Brain research**, v. 399, n. 2, p. 224–31, 10 dez. 1986.
- ZHOU, P. et al. Muscarinic acetylcholine receptor in cerebellar cortex participates in acetylcholine-

mediated blood depressor response in rats. **Neuroscience letters**, v. 593, p. 129–33, 23 abr. 2015.