



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Farmácia
Curso de Graduação em Farmácia



Fernanda Isabel Ferreira

**Efeitos do Propranolol e Metoprolol nas respostas
fisiológicas e no comportamento do tipo ansiedade em
ratos Wistar**

Ouro Preto

2023

Efeitos do Propranolol e Metoprolol nas respostas fisiológicas e no comportamento
do tipo ansiedade em ratos Wistar

Fernanda Isabel Ferreira

Trabalho Final de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção
do Grau de Farmacêutica na Universidade
Federal de Ouro Preto.

Data da aprovação: 29/08/2023

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes – UFOP

Co-orientador: Dra. Thayane Oliveira Reis – UFOP

Ouro Preto

2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

F383e Ferreira, Fernanda Isabel.

Efeitos do propranolol e metoprolol nas respostas fisiológicas e no comportamento do tipo ansiedade em ratos Wistar. [manuscrito] / Fernanda Isabel Ferreira. - 2023.

85 f.: il.: color., gráf..

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes.

Coorientadora: Dra. Thayane Oliveira Reis.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Antagonistas Adrenérgicos beta. 2. Propranolol. 3. Metoprolol. 4. Ansiedade. I. de Menezes, Rodrigo Cunha Alvim. II. Reis, Thayane Oliveira. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Isabel Ferreira

Efeitos do Propranolol e Metoprolol nas respostas fisiológicas e no comportamento do tipo ansiedade em ratos *Wistar*

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 29 de Agosto de 2023

Membros da banca

Doutor Rodrigo Cunha Alvim de Menezes - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora Thayane Oliveira Reis - Co-Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora Natália de Jesus Antunes - Universidade Estadual de Campinas
Mestre Lucas Gabriel Vieira - Universidade Federal de Ouro Preto

Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 29/08/2023



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 29/08/2023, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0582463** e o código CRC **4A62E6B3**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho e o encerramento deste ciclo aos meus pais e aos meus irmãos, que me apoiam incondicionalmente na busca por meus objetivos. E ao meu sobrinho Miguel (*in memoriam*) que abrilhantou minha vida durante sua breve passagem.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio da CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFOP.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças nos momentos em que eu achei que não seria possível seguir, e por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho.

Aos meus pais, Inêz e Edson por todo apoio e dedicação. Por não terem medido esforços para que eu alcançasse esse objetivo. Aos meus irmãos André e Luís pelo cuidado, carinho e torcida.

Ao meu namorado Vinícius, que foi meu maior suporte nesta reta final. Que abdicou de incontáveis finais de semana, me fazendo companhia enquanto analisava dados e escrevia. Que foi colo nos momentos de agonia e incentivo nos momentos de cansaço. Obrigada por ser um parceiro melhor do que eu poderia imaginar!

Aos familiares e amigos que entenderam minha ausência em tantos momentos importantes.

À república Life, meu lar em Ouro Preto, por ter me acolhido e por ter se tornado uma segunda família.

Ao meu professor e orientador Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes pela confiança depositada em mim enquanto eu ainda estava no segundo semestre da graduação. Por ter aberto as portas do laboratório, me permitindo acompanhar as atividades mesmo sem uma vaga de iniciação científica na época, e por ter sido tão presente, solícito e compreensivo ao longo desses anos.

À minha coorientadora Dra. Thayane por toda paciência, pela didática ao me treinar em cada etapa, pelas maratonas de 12 horas no laboratório com a clássica pausa para o bolinho de chocolate no Sá Chica e pelas conversas leves e descontraídas.

À equipe do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, por todo conhecimento compartilhado, pelos momentos de descontração no dia a dia ou nas viagens a congressos. Em especial Máira, Honey, Mari, Aline, Áquila, Gabi e Erica pela amizade construída. Sr. Milton e Dona Marli por todo acolhimento, ajuda, conselhos e cuidado.

Ao Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP pelos treinamentos e por garantir o fornecimento de animais que permitiram a condução deste trabalho.

Aos membros da banca por aceitarem o convite, agradeço muito pelo seu tempo e contribuição.

A todos que participaram da construção desta conquista, meu muito obrigada!

RESUMO

A ansiedade e o estresse são respostas fisiológicas e adaptativas. Envolvem alterações físicas, cognitivas e comportamentais que são importantes para a sobrevivência, mas podem se tornar patológicos a depender da frequência e duração em que são experimentados. A ansiedade patológica e os distúrbios de estresse têm sido identificados como componentes centrais dos transtornos de ansiedade, que estão entre os transtornos psiquiátricos mais prevalentes no mundo. Os medicamentos disponíveis atualmente possuem eficácia variável e estão associados a efeitos colaterais significativos. Os betabloqueadores surgem como adjuvantes para alívio dos efeitos periféricos do processo de ansiedade e propranolol, um betabloqueador não seletivo, é o mais utilizado por seus efeitos mais amplos. Entretanto a falta de seletividade pode estar associada à efeitos colaterais mais intensos. Buscamos então avaliar e comparar seus os efeitos com um antagonista seletivo beta1-adrenérgico, o metoprolol. Avaliamos a influência dos betabloqueadores nas respostas cardiovasculares, temperatura corporal e comportamento do tipo ansiedade em ratos Wistar. Os animais foram separados em três grupos: propranolol 5mg/kg, metoprolol 5mg/kg e salina 0,9% e expostos aos testes de estresse social, campo aberto, caixa de transição claro/escuro e interação social. Observamos que ambos betabloqueadores reduziram a frequência cardíaca, mas o propranolol demonstrou efeito adverso na pressão arterial média. Apenas o grupo propranolol demonstrou melhora da função motora no campo aberto, enquanto ambos tratamentos reduziram comportamento relacionado à ansiedade no claro/escuro, sugerindo efeito ansiolítico. Apesar disso, nenhum betabloqueador impactou na interação social após estresse social. O controle da temperatura corporal por propranolol foi observado em todos os testes. Interessantemente, metoprolol também reduziu hipertermia durante estresse social e campo aberto, mas não demonstrou efeito no estímulo mais intenso, em que foram combinados os testes de estresse e interação social. Apesar de o grupo propranolol apresentar melhores efeitos gerais na atividade locomotora e na hipertermia por estresse, baseados nos demais resultados, sugerimos que o uso de metoprolol na ansiedade pode ser uma alternativa eficaz e mais segura, pois está associado a menor efeito colateral.

ABSTRACT

Anxiety and stress are physiological and adaptive responses. It involves physical, cognitive, and behavioral changes that are crucial for survival, but can become pathological depending on the frequency and duration of exposure to triggering stimuli. Pathological anxiety and stress disorders have been identified as central components of anxiety disorders, which are among the most prevalent psychiatric disorders worldwide. The available treatment is not effective for all individuals and have significant side effects. Beta-blockers emerge as supplementary options for mitigating the peripheral impacts of the anxiety process and propranolol, a non-selective beta-blocker, holds the primary position due to its extensive effects. Despite that, the lack of selectivity might result in more pronounced side effects. So we aimed to compare its effects with those of a selective beta1-adrenergic antagonist, metoprolol. We evaluated how beta-blockers influence cardiovascular responses, body temperature, and anxiety-like behavior in Wistar rats. The animals were divided into three groups: propranolol 5mg/kg, metoprolol 5mg/kg, and 0.9% saline solution. The animals were subjected to social stress, open field, the light-dark box, and social interaction. Both beta-blockers reduced heart rate, although propranolol exhibited an adverse effect on mean arterial pressure. Only propranolol showed an improvement in motor function in open field test, whereas both substances reduced anxiety-related behavior in the light-dark box, indicating potential anxiolytic effects of both treatments. No impact was observed on social interaction. Propranolol consistently regulated the rats' body temperature in all tests. Interestingly, metoprolol also reduced hyperthermia during the social stress and open field, but showed no effect in the most intense stimulus, in which social stress and social interaction tests were combined. Despite propranolol group demonstrating more favorable effects on locomotor activity and stress-induced hyperthermia, considering remaining outcomes, we propose that metoprolol could be effective and safer alternative for managing anxiety, as it is associated with less side effects.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração temporal do Experimento 1. Ilustração feita pela autora com a utilização do software BioRender®.	19
Figura 2 - Modelo de estresse por rato intruso. Animal experimental (intruso) foi conectado, via cateter arterial externalizado na região dorsal, a um transdutor para coleta de PAM e FC. Ilustração da autora com a utilização do software BioRender®.	21
Figura 3 - Ilustração temporal do Experimento 2. Ilustração feita pela autora com a utilização do software BioRender®.	22
Figura 4 - Ilustração do aparato CA. Ilustração da autora com a utilização do software BioRender®.	23
Figura 5 - Ilustração da caixa de transição CE. Ilustração da autora com a utilização do software BioRender®.	24
Figura 6 - Ilustração temporal do Experimento 3. Ilustração feita pela autora com a utilização do software BioRender®.	25
Figura 7 - Teste de Interação social livre no aparato CA. Ilustração da autora com a utilização do software Biorender®.	26
Figura 8 – Imagens obtidas com a câmera termográfica ilustram temperaturas de dorso e cauda de um animal controle durante registro basal (imagem da esquerda) e no último minuto da interação social (imagem a direita).	27
Figura 9 – Influência dos tratamentos na FC e PAM de ratos expostos a estresse por rato intruso. (A) Alterações na FC evocadas pelo modelo de rato intruso. *Diferença significativa do grupo propranolol em relação ao grupo veículo controle. #Diferença significativa do grupo metoprolol em relação ao grupo veículo controle. (B) Alterações na PAM evocadas pelo modelo de rato intruso. *Diferença significativa do grupo propranolol em relação ao grupo veículo controle. #Diferença significativa do grupo metoprolol em relação ao grupo veículo controle. Valores expressos em média	

±EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$. Análise feita por ANOVA Two-way, seguida de pós-teste de Fisher. N=7.30

Figura 10 - Influência dos tratamentos na temperatura corporal de ratos expostos a estresse por rato intruso. (A) Alterações na temperatura interescapular evocadas pelo modelo de rato intruso. (B) Alterações na temperatura de cauda evocadas pelo modelo de rato intruso. *Diferença significativa do grupo propranolol em relação ao grupo veículo controle. #Diferença significativa do grupo metoprolol em relação ao grupo veículo controle. Valores expressos em média ±EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$. Análise feita por ANOVA Two-way, seguida de pós-teste de Fisher. N=7.....32

Figura 11 - Influência dos tratamentos na locomoção de ratos expostos ao CA por 5 minutos. *Diferença estatística do grupo propranolol em relação ao grupo veículo controle. Anova one-way, com pós teste Fisher ($p < 0,05$). Valores expressos em média ±EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$. Análise feita por ANOVA Two-way, seguida de pós-teste de Fisher. N=8.33

Figura 12 - Influência dos tratamentos na temperatura corporal de ratos durante exposição ao CA. (A) Alterações na temperatura interescapular durante exposição ao CA. *Diferença significativa do grupo propranolol em relação ao grupo veículo controle. #Diferença significativa do grupo metoprolol em relação ao grupo veículo controle. (B) Alterações na temperatura da cauda durante exposição ao CA. Valores expressos em média ±EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$. Análise feita por ANOVA Two-way, seguida de pós-teste de Fisher. N=8.....35

Figura 13 - Influência dos tratamentos na exploração da caixa CE durante 5 minutos. (A) Número de entradas no compartimento claro. *Diferença significativa do grupo propranolol em relação ao grupo veículo controle. #Diferença significativa do grupo metoprolol em relação ao grupo veículo controle. (B) Tempo de permanência no compartimento claro. #Diferença significativa do grupo metoprolol em relação ao grupo veículo controle. Valores expressos em média ±EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$. Análise feita por ANOVA One-way, seguida de pós-teste de Fisher. N= 8.....37

Figura 14 - Influência dos tratamentos na interação social de ratos. (A) Número total de interações durante 5 minutos. (B) Tempo total de interação social durante 5 minutos. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$. Análise feita por ANOVA One-way, seguida de pós-teste de Fisher. N= 10.38

Figura 15 - Influência dos tratamentos na temperatura de ratos expostos a estresse por rato intruso seguido de interação social no CA. (A) Temperatura interescapular. *Diferença significativa do grupo propranolol em relação ao grupo veículo controle. (B) Temperatura da cauda. *Diferença significativa do grupo propranolol em relação ao grupo veículo controle. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$. Análise feita por ANOVA Two-way, seguida de pós-teste de Fisher. N= 10.....40

LISTA DE SIGLAS

CA – Campo Aberto

CE – Claro/Escuro

FC – Frequência Cardíaca

IS – Interação Social

MET – Metoprolol

NA – Noradrenalina

PAM – Pressão Arterial Média

PROP – Propranolol

SNC – Sistema Nervoso Central

SNS – Sistema nervoso Simpático

TAM – Tecido Adiposo Marrom

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	Ansiedade.....	3
2.2	Estresse.....	5
2.3	Papel da sinalização noradrenérgica e adrenérgica	7
2.4	Farmacoterapia da ansiedade e estresse.....	10
2.5	Uso de betabloqueadores na ansiedade	11
2.5.1	Propranolol.....	12
2.5.2	Metoprolol	13
3	OBJETIVOS	14
3.1	Objetivos Gerais	14
3.2	Objetivos Específicos	14
4	METODOLOGIA	15
4.1	Aspectos éticos.....	15
4.2	Animais.....	15
4.3	Grupos de tratamento.....	16
4.4	Protocolos cirúrgicos	16
4.4.1	Canulação da artéria femoral	16
4.4.2	Implante de cânula intraperitoneal	17
4.5	Cuidados pós-operatórios.....	18
4.6	Procedimentos pré-experimentais: Protocolo de Handling	18

4.7	Delineamento Experimental 1 - Avaliação dos parâmetros cardiovasculares e temperatura corporal no estresse por rato intruso	18
4.7.1	Modelo de estresse por rato intruso	19
4.8	Delineamento Experimental 2 - Avaliação da temperatura corporal e comportamento relacionado à ansiedade no campo aberto e claro/escuro	21
4.8.1	Campo aberto	22
4.8.2	Caixa de transição claro/escuro	23
4.9	Delineamento Experimental 3 - Avaliação da temperatura corporal e ansiedade social após estresse por rato intruso	24
4.9.1	Teste de Interação Social no CA.....	25
4.10	Registros de temperatura	26
4.11	Eutanásia	27
4.12	Análise estatística	28
5	RESULTADOS.....	29
5.1	Os betabloqueadores foram eficazes no controle da FC durante o estresse, mas PROP aumentou PAM.....	29
5.2	Betabloqueadores reduzem temperatura de dorso e cauda no estresse por rato intruso.....	31
5.3	Propranolol aumentou atividade locomotora no CA.....	33
5.4	Betabloqueadores diminuem temperatura do dorso durante exposição no CA	34
5.5	Betabloqueadores diminuem comportamento do tipo ansiedade na caixa CE	36
5.6	Betabloqueadores não alteraram interação social após estresse.....	37
5.7	Propranolol diminuiu temperatura de dorso e cauda após estresse e durante interação social	38

6	DISCUSSÃO	41
7	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXOS	66

1 INTRODUÇÃO

A ansiedade e o estresse são fenômenos inerentes à experiência humana e sob condições normais, as respostas fisiológicas associadas a esses estados desempenham papéis cruciais na adaptação do organismo a desafios e ameaças (Calhoun; Tye, 2015; Margis *et al.*, 2003). Entretanto, quando essas respostas se tornam crônicas ou excessivas, podem evoluir para quadros patológicos (Castillo *et al.*, 2000). A ansiedade patológica e os distúrbios de estresse têm sido identificados como componentes centrais de várias condições psiquiátricas, como transtornos de ansiedade, depressão e transtorno de estresse pós-traumático (Castillo *et al.*, 2000; Kalin e Barbas, 2022; Shin e Liberzon, 2010).

Os transtornos de ansiedade estão entre os transtornos psiquiátricos mais prevalentes no mundo (Murrough *et al.*, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de uma em cada oito pessoas no mundo vivem com algum transtorno mental, sendo os transtornos de ansiedade e os transtornos depressivos os mais prevalentes (OMS, 2022). Como agravante, a disponibilidade de medicamentos psicotrópicos essenciais acessíveis é limitada e uma porção considerável de indivíduos patologicamente ansiosos não recebe tratamento adequado ou não responde bem aos tratamentos disponíveis (Calhoun e Tye, 2015). Tais evidências epidemiológicas ressaltam a urgência na busca por soluções efetivas e acessíveis para enfrentar este desafio global e melhorar a qualidade de vida das pessoas afetadas por essas psicopatologias.

Em muitas pesquisas, os betabloqueadores são retratados como adjuvantes à farmacoterapia convencional, enquanto estudos avaliando os efeitos da monoterapia em comparação com placebo são escassos (Boyce *et al.*, 2021). Além disso, poucos estudos realizaram comparações entre os benefícios relativos do uso de betabloqueadores com diferentes graus de seletividade para os receptores beta1, beta2 e beta3 para ansiedade. Apesar de ser conhecido que o bloqueio não seletivo dos receptores beta-adrenérgicos está relacionado a efeitos adversos mais acentuados, o propranolol é o betabloqueador mais investigado no campo da psiquiatria (Carnovale *et al.*, 2023). Além disso possui mais indicações terapêuticas e

maior experiência clínica acumulada (Oliver; Mayor Jr; D'ocon, 2019) e o seu uso no controle de ansiedade e taquicardia por ansiedade está descrito em bula.

Por outro lado, o metoprolol não está aprovado para tratamento sintomático de transtornos de ansiedade segundo a FDA (U.S. Food and Drug Administration) até a presente data (Tucker *et al.*, 2023). Entretanto, há mais de três décadas estudos já apontavam que o metoprolol poderia ser uma alternativa mais segura que o propranolol para o tratamento dos transtornos de ansiedade (Chaturvedi, 1987). Para testar essa hipótese, empregamos distintos protocolos comportamentais visando aprimorar a compreensão dos efeitos desses betabloqueadores nas respostas fisiológicas e comportamentais através de modelo animal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ansiedade

A ansiedade é um estado emocional caracterizado por inquietação e preocupação excessiva sobre eventos futuros (Castillo et al., 2000; Margis et al., 2003). Também é entendida como uma antecipação de perigo e sentimento de insegurança ou medo mesmo que não exista uma ameaça real (Castillo et al., 2000; Grupe e Nitschke, 2013; Margis et al., 2003; Shin e Liberzon, 2010).

A ansiedade é uma resposta natural do organismo a situações percebidas como ameaçadoras ou incertas, sendo comumente experienciada pelos seres humanos (Grupe; Nitschke, 2013). Em mamíferos, as respostas de defesa frente esses estímulos são controladas por uma complexa rede de estruturas cerebrais que coordenam um padrão integrado de alterações neuroendócrinas, autonômicas e comportamentais (Shin e Liberzon, 2010; Szczepanska-Sadowska, 2008). Vários neurotransmissores e hormônios, participam em maior ou menor grau da modulação e regulação dos comportamentos defensivos (Graeff, 2004; Kausche et al., 2021; Margis et al., 2003) e entre eles estão a noradrenalina (NA) e adrenalina (A), que têm recebido atenção desde a primeira demonstração do papel da excitação simpática em resposta ao estresse (Lundberg, 2007).

Os principais efeitos dessas catecolaminas incluem aumento dos batimentos cardíacos, dilatação das vias respiratórias, aumento da pressão arterial e da temperatura corporal (Lima et al., 2022; Margis et al., 2003; Olivier et al., 2003). Tais alterações são fundamentais para a sobrevivência do indivíduo pois aumentam o fluxo sanguíneo para órgãos específicos e melhoram a disponibilidade de energia, permitindo respostas rápidas a possíveis ameaças (Abreu et al., 2014; Reis et al., 2023). Além disso foi sugerido que aumentos na temperatura corporal facilitam o funcionamento do músculo cardíaco e esquelético (Bennett, 1985 apud Reis et al., 2023) e que um aumento na temperatura cerebral pode melhorar o processamento sináptico necessário para a tomada de decisões (Blessing e Ootsuka, 2016 apud Lima et al., 2022).

As respostas à ansiedade também podem se manifestar através de sintomas comportamentais, sendo comum observar em animais comportamentos como inibição de exploração e evitação da fonte de perigo (Belzung e Griebel, 2001). Estudos anteriores demonstraram que os sistemas neurais envolvidos no comportamento do tipo ansiedade em roedores são consistentes com aqueles identificados em seres humanos (Adhikari, 2014; Kenwood, Kalin e Barbas, 2022). Nesse sentido, os testes comportamentais com roedores são amplamente empregados na pesquisa científica e podem fornecer informações relevantes sobre os mecanismos subjacentes à ansiedade e transtornos ansiosos em humanos (Calhoon e Tye, 2015) visto que os circuitos envolvidos não são completamente compreendidos. Tais modelos experimentais também constituem um papel importante na avaliação da eficácia de novas drogas para transtornos ansiosos, uma vez que comportamentos semelhantes à ansiedade nessas tarefas são reduzidos por drogas ansiolíticas (Kallman, 2016; Michalak et al., 2020).

Para avaliação de comportamento do tipo ansiedade em animais, geralmente são empregados testes que se baseiam na tendência inata e conflituosa dos roedores em explorar novos espaços assim como evitar áreas abertas e iluminadas, onde podem ser mais vulneráveis a ameaças ambientais (Calhoon e Tye, 2015; Grossen e Kelley, 1972). Essas respostas comportamentais defensivas evoluíram para permitir que um organismo evite ou reduza danos e, assim, assegure sua sobrevivência (Mobbs et al., 2015). No entanto, em humanos, o medo excessivo e/ou ansiedade crônica podem ser debilitantes e são considerados patológicos (Castillo et al., 2000).

Enquanto a ansiedade fisiológica é benéfica ao organismo e não requer tratamento (Bandelow et al., 2015), passa a ser reconhecida como patológica quando exagerada e desproporcional em relação ao estímulo ou quando interfere com a qualidade de vida, o conforto emocional e desempenho das tarefas rotineiras (Allen, Leonard E Swedo, 1995; Nechita e Motorga, 2018). A ansiedade patológica está associada a uma hiperatividade do sistema límbico, incluindo a amígdala, que desempenha um papel central no processamento emocional e na resposta ao medo e ansiedade (Adhikari, 2014; Calhoon; Tye, 2015). Devido a uma antecipação

excessiva ao perigo, a amígdala pode se tornar mais sensível e reativa a estímulos que são percebidos como ameaçadores, desencadeando respostas exageradas e desadaptativas (Carlson et al., 2011a). O córtex pré-frontal, responsável pelo controle cognitivo e amplamente reconhecido por exercer controle inibitório sobre a amígdala (Barbas e García-Cabezas, 2016; Maier et al., 2006) também pode apresentar alterações que prejudicam a sua função inibitória (Ottaviani, 2018). Por consequência, essas alterações afetam a capacidade do indivíduo de avaliar e responder a estímulos ameaçadores de forma equilibrada, sendo essa uma característica central dos transtornos de ansiedade incluindo transtorno de estresse pós-traumático, transtorno de pânico, fobia social e fobia específica (Carlson et al., 2011b; Kenwood, Kalin e Barbas, 2022; Shin e Liberzon, 2010).

2.2 Estresse

Conceitualmente, estresse e ansiedade são estados emocionais distintos. Enquanto a ansiedade pode ser definida como um conjunto de respostas antecipatórias na ausência de uma ameaça real, o termo estresse caracteriza o estado gerado pela percepção de uma ameaça iminente real (Calhoun; Tye, 2015; Margis et al., 2003). Apesar disso, o estresse e a ansiedade podem compartilhar algumas sobreposições em termos de sintomas físicos e respostas comportamentais, tornando difícil sua diferenciação (Wiedemann, 2015).

Hans Selye, em seu trabalho pioneiro sobre estresse, definiu-o como uma reação fisiológica e adaptativa em resposta a estímulos físicos (frio, calor, infecção, trauma, hemorragia) ou de natureza psicológica (Selye, 1936), uma vez que dependem da interpretação do indivíduo em relação ao evento (Friedrich, Macedo e Reis, 2015). Nesse sentido, foi sugerido que a ansiedade pode representar importante estressor psicológico, exacerbando os desafios mentais e emocionais que um indivíduo enfrenta e contribuindo para uma maior carga de estresse (Grillon et al., 2007; Mesquita et al., 2016).

Ao mesmo tempo, o estresse é tido como fator de risco para ansiedade (Margis et al., 2003), uma vez que o estresse agudo e crônico interfere nos circuitos neurais

relacionados à regulação da ansiedade e do humor (Wiedemann, 2015) podendo desencadear sintomas de ansiedade ou transtornos associados (Hu et al., 2022a). Em corroboração com esses estudos, foi relatado que a exposição ao estresse agudo em indivíduos saudáveis potencializa a resposta de ansiedade (Grillon et al., 2007; Shin e Liberzon, 2010). Em outro estudo que envolveu a exposição a um teste de estresse social, foi observado um aumento nas respostas de condicionamento do medo (Jackson et al., 2006). Tais evidências indicam que as respostas de ansiedade e estresse estão inter-relacionadas e podem influenciar umas às outras (Shin; Liberzon, 2010).

Complementarmente aos estudos de Selye (1936), Lazarus e Launier (1978), definiram estresse como qualquer estímulo de demanda externa ou interna que atinja ou exceda as fontes de adaptação de um indivíduo ou sistema social (Lazarus e Launier, 1978 apud Polit e Beck 2011). Essa definição enfatiza a interação entre o contexto ambiental e a pessoa ou grupo, considerando-os como fatores desencadeadores e ativos na resposta ao estresse (Polit e Beck 2011). Nesse sentido, o modelo animal de conflito social entre membros da mesma espécie como gerador de estresse, em comparação aos modelos que utilizam estímulos físicos aversivos, como choque nas patas, contenção ou exposição ao frio, mostra-se vantajoso uma vez que, considerando-se a vida moderna, os estressores mais comuns são de origem social (Björkqvist, 2001; Eslinger et al., 2021).

Estímulos considerados estressores impulsionam ajustes fisiológicos como aumento da frequência cardíaca, pressão arterial e temperatura corporal, que por sua vez, possibilitam uma resposta eficaz diante de ameaças reais ou percebidas (Hu et al., 2022). A resposta térmica ao estresse é caracterizada como “hipertermia induzida por estresse” (Reis et al., 2023). Em animais, as variações de temperatura corporal são consideradas medidas sensíveis para avaliar o grau de estresse (Lees et al., 2020 apud Mota-Rojas Daniel et al., 2021) e o tecido adiposo marrom (TAM) está definido como principal sítio de termogênese adaptativa (Reis et al., 2023; Ueta et al., 2009).

Assim como a ansiedade, o estresse é uma experiência comum e regular para todos os seres vivos, desempenhando um papel essencial na sobrevivência (Mesquita

et al., 2016). O estresse moderado pode trazer benefícios como maior atenção e memória (Hu et al., 2022). Por outro lado, o estresse pode se tornar uma ameaça à vida quando eventos estressantes se tornam uma parte rotineira da vida dos indivíduos (Pickering et al., 2013). Vários estudos já mostraram que o estresse intenso e prolongado está associado a alterações metabólicas, risco cardiovascular, anormalidades endócrinas, alterações de humor e comprometimento das funções cognitivas (Lima Giacobbo, 2019).

Além disso, o estresse crônico causa várias respostas desadaptativas, levando a um risco aumentado de desenvolver múltiplas doenças psiquiátricas, incluindo depressão, transtornos de ansiedade e transtorno de estresse pós-traumático (Lima Giacobbo, 2019). Estudos demonstram que essas psicopatologias são caracterizadas por alterações a nível do sistema nervoso central capazes de interferir nas vias neuro-endócrinas e autonômicas acarretando sintomas neurovegetativos (Lenhardtk e Calvetti, 2017; Zamignani e Banaco, 2005), nesse cenário a intervenção farmacológica faz-se necessária (Castillo et al., 2000).

2.3 Papel da sinalização noradrenérgica e adrenérgica

A sinalização noradrenérgica desempenha um papel crucial na resposta ao estresse e à ansiedade, tanto a nível central quanto periférico (Eiden, 2013a). No sistema nervoso central, a NA é sintetizada principalmente nos neurônios localizados na região do locus coeruleus, que está localizado no tronco cerebral (Berridge e Waterhouse, 2003; O'Donnell et al., 2012). As regiões que recebem projeções do locus ceruleus incluem o córtex pré-frontal que está associado ao planejamento e tomada de decisões (Ottaviani, 2018; Tavares e Corrêa, 2006), a amígdala relacionada às respostas emocionais (Adhikari, 2014; Amano et al., 2011; Mesquita et al., 2016; Tye et al., 2011) e o hipotálamo, envolvido na regulação hormonal e resposta ao estresse (Mueller, Figueroa e Robinson-Papp, 2022). Quando as células do locus coeruleus são ativadas através dos estímulos sensoriais, há um aumento importante de NA nas fendas sinápticas dessas regiões, resultando em uma resposta neural mais intensa (Margis et al., 2003). Os receptores noradrenérgicos envolvidos nessas vias

incluem os subtipos α (alfa) e β (beta) de maneiras distintas, com α_1 e β contribuindo para a excitação neuronal e os α_2 tendendo a modular a liberação de noradrenalina (Berridge, 2008).

A sinalização noradrenérgica periférica ocorre através do sistema nervoso autônomo simpático (SNS), acarretando em liberação de NA dos terminais nervosos simpáticos que revestem vasos sanguíneos, inervam o coração (Eiden, 2013b; Reis, et al., 2014) e o tecido adiposo marrom (TAM) (Huesing et al., 2022). Além disso, este neurotransmissor pode atingir níveis significativos na corrente sanguínea pelo extravasamento da NA secretada nas sinapses em órgãos-alvo inervados por nervos simpáticos pós-glanglionares ou pelas glândulas suprarrenais, embora em menores quantidades (Goldstein et al., 1983; William Tank e Lee Wong, 2014). A noradrenalina liberada na circulação sanguínea pela medula adrenal atua como hormônio, produzindo os mesmos efeitos simpaticomiméticos nos órgãos efetores (Kawashima, 2005).

A liberação de adrenalina, por sua vez, é uma resposta periférica ao estímulo nervoso simpático na medula adrenal, projetada para amplificar rapidamente a reação ao estresse (William Tank e Lee Wong, 2014). Apesar da medula adrenal ser responsável por liberar tanto a noradrenalina quanto a adrenalina na circulação periférica, a síntese e secreção de adrenalina é predominante (Taylor et al., 1989), sendo cerca de 80% das células cromafins presentes medula adrenal envolvidas nesta função (William Tank e Lee Wong, 2014). A adrenalina é conhecida por sua ação periférica nas reações de “luta ou fuga”, tendo estudos demonstrado que o hormônio não penetra a barreira hematoencefálica mesmo em situações de estresse (Chen e Williams, 2012; Oliveira et al., 2018). Apesar disso, a adrenalina parece ser um mediador de alterações neuroquímicas relacionadas à consolidação da memória do medo (Alves et al., 2016; Toth et al., 2013) evidenciando que a resposta ao estresse é uma complexa interação entre vários sistemas, que precisam ser mais profundamente explorados.

Os efeitos de ambas catecolaminas derivam de sua ligação aos receptores adrenérgicos (Adameova, Abdellatif e Dhalla, 2009). A partir de seus diferentes

mecanismos de ação e propriedades farmacológicas, esta superfamília de receptores pode ser classificada em três subfamílias: $\alpha 1$, $\alpha 2$ e beta-adrenérgicas (Zhang et al., 2022a). A subfamília beta-adrenérgica compreende os subtipos $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$, que estão envolvidos tanto nas respostas fisiológicas quanto patológicas frente aos estímulos perturbadores internos ou externos (Repova et al., 2022; Ruan et al., 2020; Zhang et al., 2022b).

Os receptores adrenérgicos do subtipo $\beta 1$ são predominantemente expressos no tecido cardíaco e promovem aumento da frequência cardíaca e da força das contrações via estimulação adrenérgica e noradrenérgica (Wang et al., 2021; Wearing et al., 2022). Além disso aumentam a secreção de renina pelos rins e parecem estar envolvidos na termogênese (Fitzgerald, 2007). Os receptores $\beta 2$ são encontrados nos músculos lisos dos brônquios, artérias periféricas e músculo esquelético (Zhang et al., 2022b). A adrenalina tem uma afinidade maior por esses receptores em comparação com a NA, e a sua ligação ao receptor estimula o relaxamento bronquial e a vasodilatação, além de glicogenólise hepática e metabolismo lipídico (Repova et al., 2022; Zhang et al., 2022b).

Os receptores $\beta 3$ estão principalmente no tecido adiposo e são comumente atribuídos a lipólise e a termogênese no TAM devido a sua maior expressão no tecido (Babol e Błasiak, 2005). Apesar de o grau de envolvimento dos diferentes receptores β -adrenérgicos $\beta 1$ e $\beta 3$ na termorregulação não ser completamente compreendido, estudos sugerem que o SNS coordena essa resposta através da liberação de NE nas terminações nervosas simpáticas, estimulando os receptores $\beta 3$ expressos nos adipócitos marrons (Nakamura, 2015). Adicionalmente, a resposta simpática dos adrenoceptores α induz vasoconstrição cutânea, reduzindo a perda de calor (Nakamura, 2015; Ikoma et al., 2018).

Estas vias de sinalização permitem que o organismo reaja rapidamente a ameaças imediatas (Mueller, Figueroa e Robinson-Papp, 2022). No entanto, estudos têm mostrado que a hiperatividade desses sistemas pode contribuir para distúrbios de ansiedade e doenças crônicas (Esler, 2017; Turner et al., 2020). Nesse sentido, agentes moduladores da liberação, recaptção ou bloqueio da atividade de

noradrenalina e adrenalina podem ser úteis na prática clínica (Hara et al., 2013; Moreno, Moreno e Soares, 1999).

2.4 Farmacoterapia da ansiedade e estresse

Os medicamentos usados para transtornos de ansiedade incluem benzodiazepínicos, inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRSs), inibidores de recaptção de serotonina-noradrenalina (SNRIs), pregabalina, antidepressivos tricíclicos e opipramol, moclobemida, fenelzina, buspirona e hidroxizina (Bandelow et al., 2015). Atualmente os medicamentos de primeira escolha são os ISRSs e os SNRIs, enquanto o uso rotineiro de benzodiazepínicos não é recomendado devido ao risco de desenvolvimento de dependência e de outros efeitos adversos (Thibaut, 2017).

Nos últimos anos têm-se verificado um avanço no tratamento farmacológico da ansiedade, em que os benzodiazepínicos são substituídos por outras drogas que possuem menos efeitos colaterais (Maciel et al., 2015). Mas mesmo os medicamentos de primeira linha podem ter efeitos colaterais significativos que diminuem a adesão dos pacientes ao tratamento (Calhoon e Tye, 2015). Além disso, os tratamentos disponíveis não aliviam com sucesso a ansiedade em todos os pacientes. Um estudo demonstrou que menos de 60% dos pacientes com transtorno de estresse pós-traumático responderam ao tratamento inibidores seletivos da recaptção de serotonina (Steiner et al., 2007). A heterogeneidade dos transtornos de ansiedade e a presença de condições psicológicas concomitantes, como ansiedade e depressão, podem justificar os desafios significativos no desenvolvimento de novas drogas e abordagens terapêuticas (Castillo et al., 2000).

Em evidência disto, há mais de 20 anos nenhum medicamento inovador é aprovado para essas patologias apesar de progressos no entendimento dos transtornos de ansiedade (Murrough et al., 2015). Nesse cenário, o reposicionamento de drogas emerge como uma abordagem promissora. Dado o papel crítico da sinalização noradrenérgica e adrenérgica na modulação da ansiedade e do estresse, os fármacos antagonistas beta-adrenérgicos têm sido usados como medicamentos

ansiolíticos (Steenen et al., 2016). Eles podem apresentar vantagens no tratamento agudo do estresse por terem efeito rápido, ao contrário dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRSs) e por não viciarem e nem causarem sonolência como os benzodiazepínicos (Andreatini, Boerngen-Lacerda e Zorzetto Filho, 2001a; Lynn, 2010).

2.5 Uso de betabloqueadores na ansiedade

Os antagonistas dos receptores beta-adrenérgicos, ou betabloqueadores, inibem a ação das catecolaminas epinefrina e norepinefrina nos receptores beta-adrenérgicos (Helfand et al., 2007) e diminuem sintomas periféricos do processo de ansiedade como batimento cardíaco acelerado, respiração rápida, tremor e sudorese (Repova et al., 2022).

Podem ser prescritos associados aos ansiolíticos sobretudo numa crise, em que os sintomas autonômicos se tornam muito intensos devido a hiperatividade adrenérgica (Andreatini, Boerngen-Lacerda e Zorzetto Filho, 2001a). Visto que o agente ansiolítico deve reduzir a ansiedade e exercer um efeito calmante com pouco ou nenhum efeito sobre as funções motoras, a associação é justificada (Weir, 2009).

Atualmente, é amplamente reconhecido que esses compostos não apenas exercem efeitos periféricos, mas também atuam de forma significativa no sistema nervoso central (Steenen et al., 2016). No entanto, as indicações clínicas concentram-se no manejo dos componentes autonômicos da ansiedade (Fogari e Zoppi, 2004; Steenen et al., 2016). Sendo assim, eles são classificados como opções terapêuticas secundárias ou terciárias no tratamento dos transtornos de ansiedade (Andreatini, Boerngen-Lacerda e Zorzetto Filho, 2001b).

Os antagonistas beta-adrenérgicos diferem na afinidade aos receptores adrenérgicos, sendo classificados como não seletivos quando bloqueiam os receptores β_1 , β_2 e β_3 , e como cardioseletivos quando bloqueiam apenas os receptores adrenérgicos β_1 (Eren et al., 2018). Os fármacos betabloqueadores

utilizados neste estudo foram o propranolol, como representante dos betabloqueadores não seletivos, e metoprolol dos seletivos.

2.5.1 Propranolol

O propranolol (PROP) foi o primeiro antagonista beta adrenérgico sintetizado. É um betabloqueador não seletivo, ou seja, age com igual afinidade nas diferentes subfamílias dos receptores β -adrenérgicos competindo no nível do receptor com as catecolaminas, bloqueando seus efeitos (Black et al., 1964 apud Steenen et al., 2016).

Clinicamente, PROP é utilizado para atingir locais periféricos do sistema noradrenérgico para tratar hipertensão, doença arterial coronariana e taquiarritmias (Webb et al., 2010). Além das ações descritas para ação periférica, o propranolol pode ser utilizado como betabloqueador no sistema nervoso central, devido sua alta lipofilicidade que o permite atravessar a barreira hematoencefálica (Steenen et al., 2016). Devido a essa característica, desde o início dos anos 1960 o seu potencial ansiolítico vem sendo explorado (Turner & Granville-Grossman, 1965 apud Steenen et al., 2016).

Estudos demonstraram sua eficácia na redução de muitos sintomas exacerbados e prejudiciais em situações de ansiedade e estresse, causados majoritariamente por resposta simpática adrenérgica (De Moraes Miranda *et al.*, 2017). PROP demonstrou eficácia em estados angustiantes pontuais, como medo do palco (Brantigan et al., 1982), ansiedade de desempenho em músicos (Clark e Agras, 1991) e medo de cirurgia (Liu, Milgrom e Fiset, 1991; Mealy et al., 1996). No entanto, Steenen e colegas (2016) questionam sua eficácia no tratamento de distúrbios de ansiedade defendendo que as informações clínicas disponíveis não são adequadas para sustentar seu uso rotineiro.

Um dos problemas do uso de betabloqueadores não seletivos é sua ação nos receptores β_2 localizados nos brônquios, podendo iniciar ou exacerbar broncoespasmos (Weir, 2009). Dessa forma, acredita-se que os efeitos adversos dos betabloqueadores não seletivos como o propranolol, estejam relacionados à ligação

aos receptores β_2 (Eren *et al.*, 2018). Existem algumas drogas seletivas que têm maior afinidade para receptores β_1 comparados com receptores β_2 (Zhou *et al.*, 2014) como por exemplo o metoprolol, que pode ser uma alternativa aos fármacos não seletivos, reduzindo os efeitos adversos associados.

2.5.2 Metoprolol

O metoprolol (MET) é um antagonista seletivo β_1 adrenérgico, amplamente utilizado desde 1975, com comprovada eficácia na redução de eventos cardiovasculares e mortalidade em pacientes com hipertensão e doença coronariana (Eren *et al.*, 2018).

Modificações na estrutura do antagonista β -adrenérgico de primeira geração (propranolol) levaram à descoberta de importantes antagonistas β_1 cardiosseletivos, entre eles, o metoprolol (Riddell, Harron e Shanks, 1987). Devido à sua afinidade aos receptores adrenérgicos do tipo β_1 , o MET não apresenta efeito adverso significativo sobre o sistema respiratório, sistema cardiovascular e metabolismo (Mcdevitt, 1986 apud Eren *et al.*, 2018).

O metoprolol bloqueia os receptores β_1 presentes no coração, onde regulam o aumento da frequência cardíaca e da força de contração, nos rins, onde influenciam a liberação de renina e, conseqüentemente, a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, e nos adipócitos, onde controlam o processo de lipólise (Brodde, 2008). O MET é moderadamente lipofílico e consegue atravessar a barreira hematoencefálica e se ligar aos receptores β -adrenérgicos expressos no SNC, apresentando dessa forma, potencial efeito ansiolítico (Boyce *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos dos betabloqueadores propranolol e metoprolol na reatividade cardiovascular, temperatura corporal e comportamento do tipo ansiedade em ratos Wistar.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar e comparar efeitos de antagonista beta-adrenérgico seletivo (metoprolol) e não seletivo (propranolol) na regulação da frequência cardíaca e pressão arterial durante e após estresse social;
- Avaliar e comparar efeitos de antagonista beta-adrenérgico seletivo e não seletivo no comportamento do tipo ansiedade no campo aberto e caixa claro/escuro;
- Avaliar e comparar efeitos de antagonista beta-adrenérgico seletivo e não seletivo na interação social após estresse por rato intruso;
- Avaliar e comparar efeitos de antagonista beta seletivo e antagonista beta não seletivo no controle da temperatura da cauda e temperatura do dorso durante situações emocionalmente desafiadoras.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

Todos os protocolos experimentais foram realizados segundo as normas e princípios éticos de experimentação em animais de laboratório estabelecidos pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), 2016. O início dos experimentos se deu após aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP), através dos seguintes protocolos: Protocolo nº 1667240418 (anexo I) e Protocolo nº 3931110520 (anexo II).

4.2 Animais

Foram utilizados 107 ratos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 250-350g, provenientes do Centro de Ciência Animal Universidade Federal de Ouro Preto – CCA UFOP. E a escolha desta linhagem se baseia no seu fácil manuseio, na sua aplicabilidade para análises de respostas comportamentais e na facilidade de obtenção no biotério da instituição. O desenvolvimento ocorreu no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da Universidade Federal de Ouro Preto – LFC UFOP, cujo biotério local conta com regulação de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclos claro/escuro de 12 horas, com início do claro às 6:00 horas a.m.)

Antes dos procedimentos cirúrgicos (descritos a seguir), os animais foram alojados coletivamente em grupos de três ou quatro ratos (a depender do peso corporal) em caixas de polipropileno com dimensões de 41x34x17cm, contendo maravalha autoclavada, permitindo acomodação e espaço suficiente para a espécie. Foi realizada limpeza das gaiolas três vezes por semana.

Após a execução dos protocolos cirúrgicos, os animais passaram a ser alojados individualmente em gaiolas com dimensões de 30x19x13cm, para a devida recuperação antes dos protocolos experimentais. Destes, foi avaliada a necessidade de limpeza das gaiolas de forma a não prejudicar a recuperação dos animais nem gerar impacto nos experimentos. Todos os animais contaram com livre acesso à água e alimentação (ração comercial Nuvilab®).

4.3 Grupos de tratamento

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: propranolol 5 mg/kg, metoprolol 5 mg/kg, e veículo salina 0,9% (solução fisiológica comercial Sorimax®). Todos os fármacos utilizados foram diluídos em solução salina 0,9% para obtenção das concentrações teste e armazenados em freezer -20°C em alíquotas de 0,4mL. No dia do experimento foram retirados da geladeira e injetados em temperatura ambiente.

Todos os tratamentos foram administrados através da cânula com acesso à região intraperitoneal 15 minutos antes do início dos protocolos experimentais no volume de 0,1 mL/100g peso animal.

4.4 Protocolos cirúrgicos

4.4.1 Canulação da artéria femoral

Para registro dos parâmetros cardiovasculares em nosso estudo (experimento 1), os animais foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria femoral. Para tal procedimento, foi confeccionado um cateter de polietileno com 4 cm de tubo PE-10 (Clay Adams, Parsipanny, NJ, EUA) soldado por aquecimento a um tubo PE-50 com aproximadamente 15 cm.

Os ratos foram anestesiados com solução de Ketamina e Xilazina, preparada pela adição de 2 mL de Xilazina 2% (p/v) a 10 mL de Ketamina 10% (p/v). Utilizada da seguinte forma: dose (Ketamina: 80mg/kg; Xilazina: 7mg/kg) e volume (0,1 mL/100g peso corporal ip). Após anestesia, foi feita a tricotomia da região inguinal e do dorso, seguida de assepsia desses locais com PVPI degermante.

Através de uma pequena incisão na região inguinal, o trígono femoral foi exposto, os vasos femorais identificados e separados do nervo femoral. O cateter foi preenchido com solução de salina heparinizada (125 UI/mL) para evitar a formação de trombo e oclusão da cânula. A extremidade de maior diâmetro (PE-50) foi ocluída com um pino de aço, enquanto a porção de menor diâmetro foi introduzida na artéria femoral do animal até alcançar a aorta abdominal.

Após ser devidamente inserido e fixado na artéria femoral, o catéter foi passado pelo tecido subcutâneo com auxílio de um trocáter até a sua exteriorização em uma pequena incisão feita na região interescapular do animal. No dia dos experimentos, esta extremidade exteriorizada foi conectada a um transdutor de sinais que possibilitou o registro dos sinais de PAM e FC.

4.4.2 Implante de cânula intraperitoneal

A injeção intraperitoneal (IP) é um método comum para administração de medicamentos em ratos antes de um protocolo comportamental. Existem duas formas de realizar a injeção IP: com uma agulha ou uma cânula intraperitoneal.

A injeção IP com uma agulha é realizada diretamente no abdômen do rato e embora seja um método comum, pode causar algum desconforto e dor ao animal, o que por sua vez, pode gerar interferência na avaliação de testes comportamentais e respostas à ansiolíticos (Vinkers et. al., 2009). Visando mitigar este fator estressor nos protocolos experimentais deste estudo, os animais foram submetidos ao implante cirúrgico de uma cânula na cavidade peritoneal.

A cânula utilizada foi confeccionada com tubo fino e flexível de polietileno (PE-50 Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA), medindo de 10 a 12 cm, preenchida com salina e uma de suas extremidades foi ocluída com um pino de aço.

Estando os animais anestesiados com solução de Ketamina e Xilasina, foi iniciada a tricotomia da região dorsal, próximo à região do tecido adiposo marrom e na região abdominal próximo ao processo xifóide, onde posteriormente, foram feitas pequenas incisões. Pela incisão da região abdominal, a cartilagem do processo xifóide foi exposta e a cânula foi fixada na mesma por meio de sutura. Então, a cânula foi passada pelo tecido subcutâneo do animal, com o auxílio de um pequeno tubo de metal (trocáter) até a pequena incisão feita na região escapular, onde ficou externalizada. Terminado o procedimento, os locais de incisão foram suturados.

4.5 Cuidados pós-operatórios

Para auxiliar a recuperação e prevenir a ocorrência de inflamação e infecção, ao término das cirurgias, os animais receberam injeção subcutânea de antibiótico (pentabiótico veterinário com dose de 48.000UI de penicilina, 20mg de estreptomicina e 20 mg de diidroestreptomicina/kg) e antiinflamatório (Ketoflex 1% p/v, dose 4mg/Kg), ambos no volume de 0,1 mL/100g peso animal. E foram mantidos sob manta térmica até o fim do efeito anestésico.

4.6 Procedimentos pré-experimentais: Protocolo de Handling

O termo handling traduzindo do inglês, significa “manuseio” ou “manipulação”. Na experimentação animal, é uma técnica que consiste no contato regular e suave do pesquisador com o animal, com o objetivo de habitué-los ao contato humano, diminuindo o medo em relação ao manipulador (De Noronha *et al.*, 2017; Chirico *et al.*, 2018).

A técnica foi incorporada em nossos experimentos como etapa prévia aos protocolos experimentais, em que os ratos tiveram contato prévio com seu manipulador por um período de 10 minutos, divididos em duas seções de 5 minutos com intervalo de 24h entre elas. Este é considerado um procedimento simples, que pode melhorar a qualidade dos dados em experimentos com roedores, principalmente nos testes de avaliação comportamental (Campos *et al.*, 2019).

4.7 Delineamento Experimental 1 - Avaliação dos parâmetros cardiovasculares e temperatura corporal no estresse por rato intruso

A figura 1 ilustra os procedimentos adotados para a condução do primeiro protocolo experimental. Inicialmente, os animais foram habituados ao experimentador pelo Protocolo de Handling (dias 0 e 1). No segundo dia os animais foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria femoral e logo na sequência, foi implantado cateter intraperitoneal. Após 48 horas de recuperação, os ratos foram levados a uma sala

silenciosa, com parâmetros de iluminação (60 lux) e temperatura ($23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) adequados para realização dos experimentos.

Os animais permaneceram na sala experimental por 30 minutos para que fosse possível sua habituação ao novo ambiente. Decorrido o tempo de ambientação, os animais foram conectados ao sistema de transdução de sinais para registro dos parâmetros cardiovasculares e então submetidos ao estresse social por rato intruso. Ambos procedimentos são descritos nos tópicos a seguir.



Figura 1 - Ilustração temporal do Experimento 1. Ilustração feita pela autora com a utilização do software BioRender®.

No dia do experimento (dia 5), a extremidade dorsal do cateter arterial foi conectada a um transdutor de sinais ligado ao sistema de aquisição de dados PowerLab 4/20 (ADInstruments). Tal sistema, em conjunto com o software de leitura Chart 7 para Windows, possibilitou a coleta contínua da PA, calculando a partir desta, os valores de pressão arterial média (PAM) e FC.

Quando os parâmetros cardiovasculares foram estabilizados com frequência cardíaca entre 350-380 batimentos por minuto (BPM) e pressão arterial média entre 90-110 mmHg (PAM) cronometramos o registro de basal por 10 minutos. Após este registro basal foram injetados os tratamentos (de acordo com cada grupo experimental) com o animal ainda conectado ao sistema. Passados 15 minutos, o animal foi submetido ao protocolo de estresse social.

4.7.1 Modelo de estresse por rato intruso

Existe uma ampla variedade de estímulos e testes sociais usados como fonte de estresse usados em experimentação animal, sendo comum que esses testes passem por adaptações ao longo do tempo, e também que a denominação dos

mesmos seja variável na literatura (Toth *et al.*, 2013). Dentre os paradigmas de estresse social, é possível citar o isolamento social, a derrota social, novidade social a superlotação das caixas de residência entre outros (Lukas *et al.*, 2013; Toth, Neumann e Slattery, 2012).

No presente estudo, foi utilizado um modelo de novidade social por rato intruso desenvolvido e padronizado pelo Laboratório de Fisiologia Cardiovascular – UFOP (Mesquita *et al.*, 2016), também denominado como estresse por rato intruso em nossos estudos mais recentes (Reis *et al.*, 2023).

O protocolo foi adaptado dos modelos de rato intruso descrito por Mohammed (2014) e derrota social utilizado por Kenney (2006). No primeiro, animais desconhecidos (intrusos) de mesmo peso e idade eram inseridos nas caixas de residência dos animais experimentais alojados individualmente (residentes), onde podiam interagir livremente por um tempo determinado.

Já o modelo de Kenney (2006), consiste em inserir o animal experimental na gaiola de um residente não familiar maior e agressivo, onde interagem livremente até que ocorra um contato agressivo ou até que o intruso adote uma postura de submissão (encolhimento, imobilidade ou exposição da barriga). Após isto, os mesmos são separados por uma grade perfurada que permite contato sensorial e, esta interação por sua vez, gera estresse extra no roedor derrotado.

No nosso protocolo, inserimos o animal de estudo como intruso na caixa de um animal residente contido em uma gaiola de aço perfurada (Figura 2 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Antes do início do experimento, os animais residentes foram alojados individualmente e as caixas de residência não foram limpas nas 48h que antecederam o experimento a fim de deixar a maravalha impregnada com o seu cheiro.

O animal experimental (intruso) permaneceu na caixa do co-específico não familiar por 20 minutos, onde pôde ver, ouvir e sentir o cheiro do residente. Durante todo o experimento, o animal permaneceu conectado ao sistema de registro de PAM e FC através de um conector extenso, que permitia sua livre locomoção. Terminado o tempo do procedimento de estresse, o animal intruso foi retirado de dentro da caixa

do outro animal e colocado novamente na sua, permanecendo conectado ao sistema de coleta de dados cardiovasculares por mais 10 minutos.

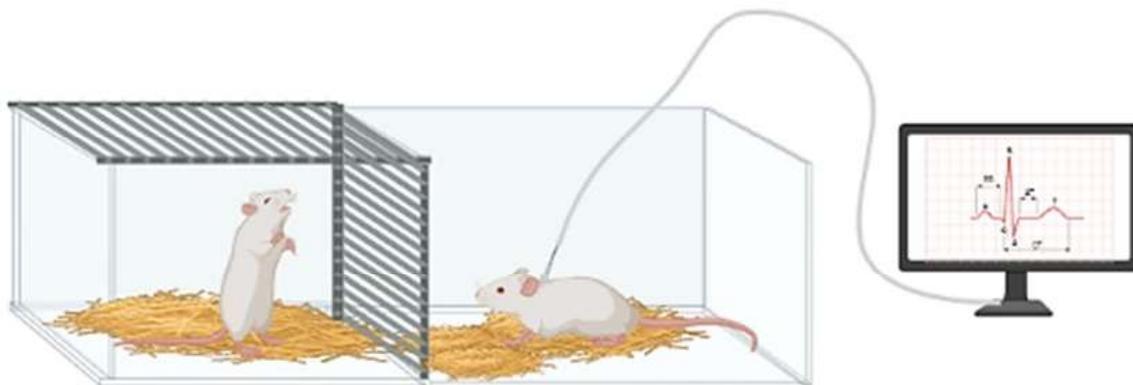


Figura 2 - Modelo de estresse por rato intruso. Animal experimental (intruso) foi conectado, via cateter arterial externalizado na região dorsal, a um transdutor para coleta de PAM e FC. Ilustração da autora com a utilização do software BioRender®.

4.8 Delineamento Experimental 2 - Avaliação da temperatura corporal e comportamento relacionado à ansiedade no campo aberto e claro/escuro

No segundo experimento, nosso foco foi avaliar as respostas comportamentais dos animais após a administração de betabloqueadores. Portanto, para minimizar o estresse cirúrgico neste grupo experimental, os animais foram submetidos apenas à cirurgia de implante de cânula na cavidade peritoneal.

Conforme ilustrado na Figura 3, após passarem pelo procedimento cirúrgico (dia 0) os animais permaneceram em recuperação pós-cirúrgica por um período de 7 dias, até a condução dos experimentos. Nos dois dias que antecederam os testes, os animais tiveram contato prévio com o pesquisador através do Protocolo de Handling.

No sétimo dia, os animais foram levados à sala de experimentação, onde permaneceram por 30 minutos para ambientação. Então foi administrado o tratamento para cada grupo (PROP 5mg/kg ou MET 5mg/kg ou veículo salina 0,9% i.p) e após 15 minutos, os animais foram submetidos aos testes comportamentais campo aberto e caixa de transição claro/escuro.



Figura 3 - Ilustração temporal do Experimento 2. Ilustração feita pela autora com a utilização do software BioRender®.

4.8.1 Campo aberto

O campo aberto (CA) é uma ferramenta importante para avaliar a atividade locomotora de ratos, bem como sua ansiedade e comportamento exploratório. O teste é realizado em uma arena aberta, geralmente quadrada e com paredes altas, onde o rato é colocado no centro e sua atividade é registrada por um observador ou por um sistema de monitoramento de vídeo (Hall, 1934, Chirico *et al.*, 2018).

O aparato utilizado em nosso estudo consiste em uma arena quadrada (72 cm de largura x 72 cm de comprimento) com paredes laterais de 36 cm de altura. A arena foi confeccionada com acrílico preto e o fundo foi demarcado em 16 quadrados do mesmo tamanho (18 x 18 cm cada), conforme ilustra a Figura 4.

O teste foi realizado da seguinte maneira: os ratos foram colocados no centro do CA e puderam explorar livremente o ambiente por cinco minutos, enquanto seus movimentos eram registrados por uma webcam montada acima da arena. Os vídeos foram analisados posteriormente, e o número de quadrantes percorridos neste intervalo de tempo foi usado como parâmetro de atividade locomotora (Santos *et al.*, 2023).

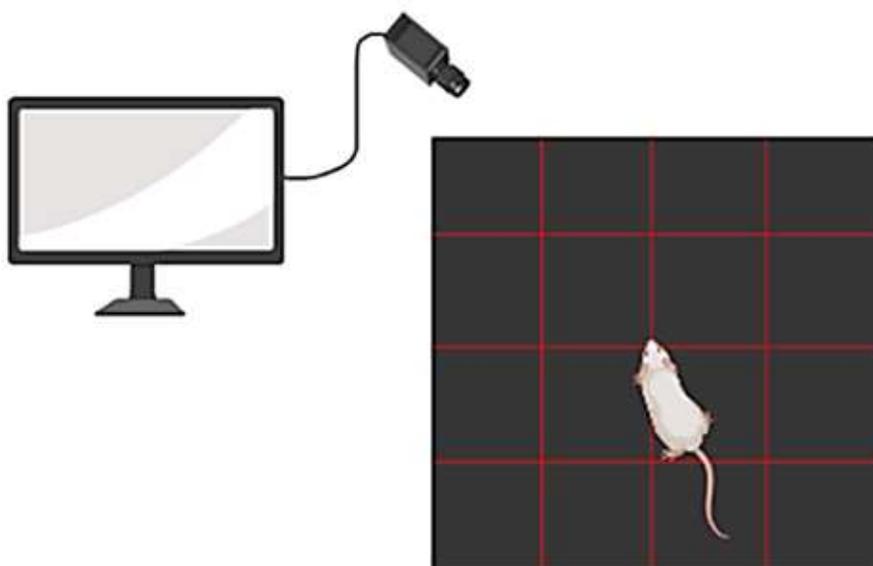


Figura 4 - Ilustração do aparato CA. Ilustração da autora com a utilização do software BioRender®.

Durante a exposição no CA, também foram monitoradas as temperaturas de dorso e cauda dos animais. Foram capturadas imagens termais antes da administração dos tratamentos (basal), após o tratamento, e em cada minuto durante a exploração dos animais na arena para posterior análise.

Decorrido o tempo de cinco minutos, os animais foram retirados do CA e retornados às suas caixas de residência. E ao final de cada teste, o aparato foi cuidadosamente higienizado com álcool 20% e seco antes da inserção de novo animal experimental (Chírigo *et al.*, 2018).

4.8.2 Caixa de transição claro/escuro

Um minuto após a realização do CA, os animais foram expostos à caixa claro/escuro (CE). O aparato consiste em uma caixa dividida em duas partes, uma clara (ou transparente) e outra escura, conectadas por um pequeno orifício central (Figura 5) e é um teste comportamental amplamente utilizado para avaliar a ansiedade em roedores (Bourin e Hascoët, 2003).

Para condução do teste, o animal é colocado na área clara do aparato, com o corpo e olhar direcionados à abertura central da caixa. A partir do momento que o animal entra na parte escura, sua exploração aos dois compartimentos foi monitorada por cinco minutos. Na análise, foram quantificados o número de vezes que o rato saiu para a parte clara e o tempo total de permanência na parte clara durante os cinco minutos de experimento (Strauss, Vicente e Zangrossi, 2013; Chírigo *et al.*, 2018). Baseando-se na premissa que ratos naturalmente têm preferência por ambientes escuros, a transição para a área clara é utilizada como um medidor da ansiedade nesta espécie (Ramos *et al.*, 2008).



Figura 5 - Ilustração da caixa de transição CE. Ilustração da autora com a utilização do software BioRender®.

4.9 Delineamento Experimental 3 - Avaliação da temperatura corporal e ansiedade social após estresse por rato intruso

No terceiro e último ensaio experimental, adotamos o mesmo protocolo cirúrgico e período de recuperação pós-operatório do experimento anterior, além do Protocolo Handling (no quinto e sexto dia) como ilustra a Figura 6. Adicionalmente, neste protocolo, um dia antes do experimento, os animais foram levados à sala experimental para a familiarização com o CA.

A pré-exposição ao CA consistiu no posicionamento do animal em experimentação no centro da arena, deixando-o explorá-la livremente por 5 minutos.

Sabendo que a exposição a um novo ambiente pode causar ansiedade e estresse em animais, o objetivo foi minimizar este fator estressante para a avaliação das respostas comportamentais ao estímulo social em detrimento do aparato experimental (Strauss, Vicente e Zangrossi, 2013).

No dia 7, os mesmos procedimentos do experimento 2 também foram adotados: Habituação à sala experimental por 30 minutos e Protocolo de Tratamento de 15 minutos antes do início dos experimentos. Neste estudo, os animais foram expostos ao protocolo de estresse por rato intruso (descrito no experimento 1), seguido de interação social livre no CA.



Figura 6 - Ilustração temporal do Experimento 3. Ilustração feita pela autora com a utilização do software BioRender®.

4.9.1 Teste de Interação Social no CA

Existem diversos testes criados para avaliar a sociabilidade em roedores, que se baseiam na tendência dos animais em preferir passar tempo com indivíduos da mesma espécie do que ficar sozinho, ou em explorar estímulos sociais em vez de estímulos não-sociais (Lukas et al. 2013). O monitoramento e quantificação da interação social em uma arena que permite livre exploração entre dois animais, é um modelo comumente utilizado para avaliar a ansiedade social, uma vez que um estímulo estressante prévio pode afetar significativamente o interesse social e o comportamento relacionado à ansiedade em animais (File e Seth, 2003).

O teste consistiu na inserção simultânea do rato experimental e de co-específico não familiar em extremidades opostas do CA, onde puderam interagir por 5 minutos. A fim de evitar comportamento de dominância por um dos animais e possíveis interações agressivas, foram selecionados pares do mesmo gênero, idade e peso

similar. As sessões foram registradas por webcam montada acima da arena (Figura 7) e posteriormente analisadas com o auxílio do Software ODLLog®.

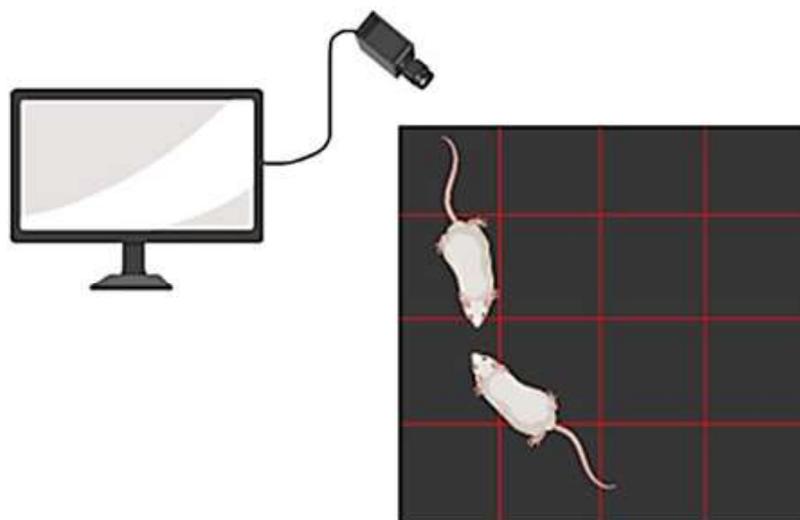


Figura 7 - Teste de Interação social livre no aparato CA. Ilustração da autora com a utilização do software Biorender®.

A interação social foi quantificada através do número de vezes que o animal experimental demonstrou comportamentos de interação social ativa como cheirar, tocar, perseguir e montar/rolar sobre o parceiro. Assim como a duração de cada um desses comportamentos (Mesquita, 2016). Assim como nos experimentos anteriores, também registramos a temperatura corporal dos animais através de câmera termográfica para posterior análise.

4.10 Registros de temperatura

Para avaliação da temperatura corporal dos animais durante nossos experimentos, foram registradas através de câmera de termografia infravermelha, temperatura do dorso e da cauda. Tais regiões são pertinentes para avaliação de hipertermia por estresse pois o TAM, responsável pela produção de calor em tais situações, situa-se na região interescapular de ratos e a cauda é a principal

responsável pela dissipação do calor produzido nessa espécie (Lima *et al.*, 2022; Reis *et al.*, 2023).

Diferentemente de outros métodos de monitoramento de temperatura em animais, como termômetros retais, a câmera termográfica não requer contato físico com o animal, o que minimiza o estresse e desconforto (Całkosiński, 2015). A câmera utilizada em nossos experimentos possui sensibilidade térmica de 0,07 °C (FLIR E40-Serie, FLIR® System Inc., Wilsonville, OR, EUA). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software FLIR Research IR.

A figura 8 ilustra imagens de termografia infravermelha de um rato tiradas em dois momentos: (1) antes de ser exposto ao estresse e (2) no minuto final da exposição ao estímulo estressor.

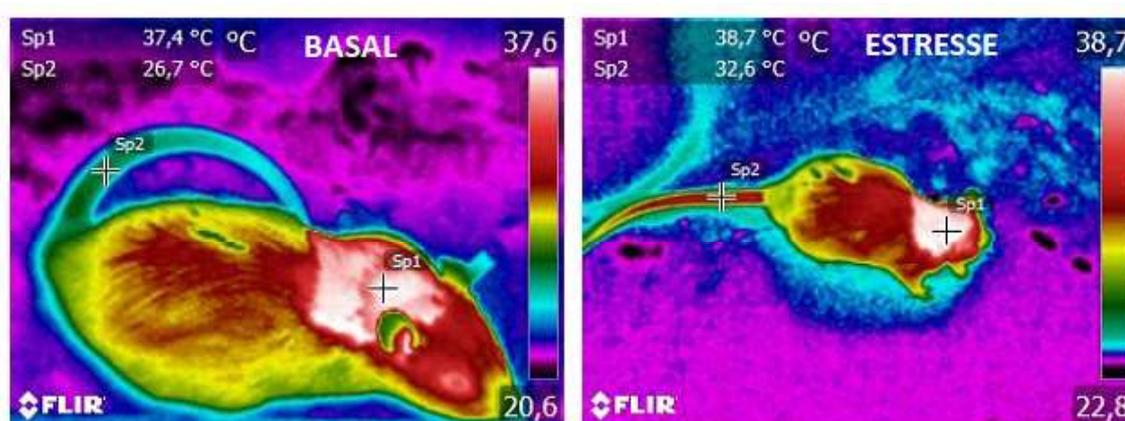


Figura 8 – Imagens obtidas com a câmera termográfica ilustram temperaturas de dorso e cauda de um animal controle durante registro basal (imagem da esquerda) e no último minuto da interação social (imagem a direita).

4.11 Eutanásia

Após 90 minutos do fim da exposição aos testes comportamentais, os animais receberam, através da cânula intraperitoneal, superdosagem da solução de Ketamina e Xilasina, preparada pela adição de 2 mL de Xilazina 2% (p/v) a 10 mL de Ketamina 10% (p/v). Posteriormente foi realizada a perfusão transcardíaca com tampão fosfato salina (PBS) 0,9%, seguido de solução de paraformaldeído (PFA) 4%.

Os cérebros foram retirados rapidamente e colocados em solução de formaldeído tamponado 4% por 24 horas, em seguida, foram imersos em solução de sacarose 30% até a saturação. Na sequência, foram armazenados em freezer -80°C para posterior análise imunohistoquímica de quantificação da proteína c-Fos (um marcador de ativação neuronal).

4.12 Análise estatística

Os dados foram analisados com o auxílio do programa de análise estatística GraphPad Prism® (versão 6.01, GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA) e expressos como média \pm erro padrão. Para as análises de FC, PAM e temperatura, utilizamos o teste Two-way ANOVA seguido por pós-teste de Fisher's LSD. Na avaliação dos dados de CA, CE e IS foi utilizado o teste one-way ANOVA, também seguido por pós-teste de Fisher's LSD. Em todos os experimentos, o nível de significância é considerado quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Os betabloqueadores foram eficazes no controle da FC durante o estresse, mas PROP aumentou PAM

Observamos que tanto propranolol quanto metoprolol reduziram a FC dos animais após 15 minutos de tratamento assim como controlaram a FC durante e após estresse por rato intruso. A figura 9A representa os dados de FC dos animais durante todo o protocolo experimental (registro basal inicial, após 15 minutos de injeção dos tratamentos, durante o estresse e recuperação).

Os dados foram avaliados pelo teste Two-way ANOVA, que demonstrou diferença significativa nas variáveis tempo [F (16,96) = 4,985; $p < 0,0001$], tratamento [F (3,18) = 19,21; $p < 0,0001$] e interação entre tratamento x tempo [F (48,28) = 3,59; $p < ,0001$]. O pós-teste de Fisher mostrou efeitos significativos na redução da frequência cardíaca do MET ($p < 0,0001$) e PROP ($p = 0,0002$) em relação ao controle antes do estresse social (Basal'). MET manteve a significância ($p < 0,05$) durante os 20 minutos de estresse assim como nos 10 minutos de recuperação, enquanto PROP deixou de ser significativo ($p > 0,05$) apenas do quarto ao oitavo minuto de recuperação.

Apesar dos efeitos positivos sobre a FC, em nosso estudo PROP gerou aumento de pressão arterial mesmo antes da exposição ao evento estressor, A figura 9B apresenta os dados de PAM, cuja análise ANOVA de dois fatores demonstrou efeito no tempo [F (16,96) = 13,60; $p < 0,0001$] e na interação entre tempo e tratamento [F (48,28) = 1,987; $p = 0,0003$], não sendo significativo apenas para tratamento [F (3,18) = 1,574; $p = 0,2303$]. Pela análise com pós-teste de Fisher, no grupo PROP o aumento da PAM foi significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) e tal efeito perdurou até o minuto final do protocolo experimental. O MET gerou leve diminuição na PAM mas só apresentou efeito significativo no último minuto do estresse ($p=0,0342$), entre o quarto ($p= 0,0225$) e sexto minuto ($p= 0,0373$) de recuperação.

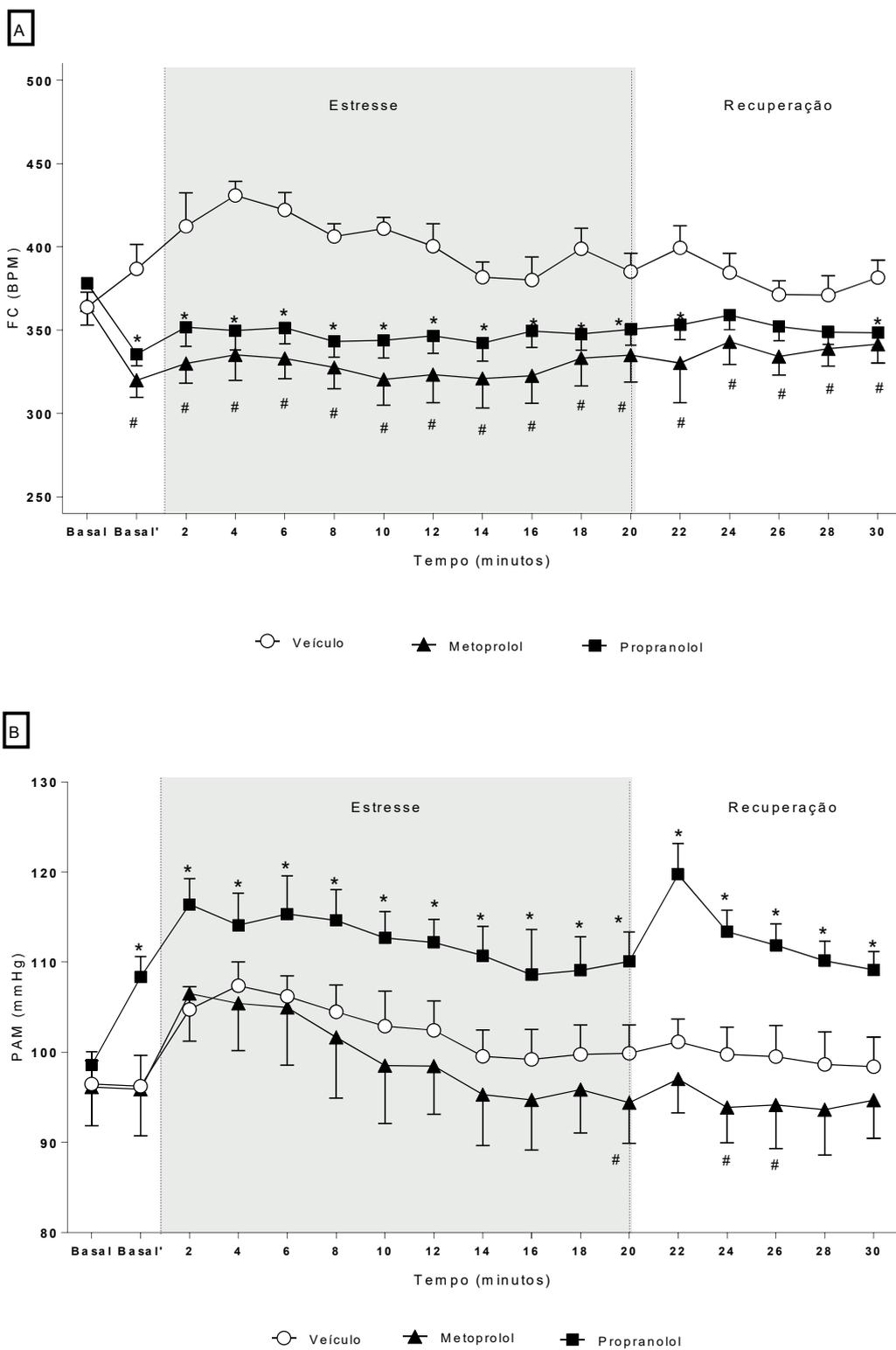


Figura 9 – Influência dos tratamentos na FC e PAM de ratos expostos a estresse por rato intruso. (A) Alterações na FC evocadas pelo modelo de rato intruso. *Diferença significativa do grupo propranolol

em relação ao grupo veículo controle. #Diferença significativa do grupo metoprolol em relação ao grupo veículo controle. (B) Alterações na PAM evocadas pelo modelo de rato intruso. *Diferença significativa do grupo propranolol em relação ao grupo veículo controle. #Diferença significativa do grupo metoprolol em relação ao grupo veículo controle. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$. Análise feita por ANOVA Two-way, seguida de pós-teste de Fisher. N=7.

5.2 Betabloqueadores reduzem temperatura de dorso e cauda no estresse por rato intruso

Observamos que ambos betabloqueadores diminuíram as temperaturas de dorso e cauda no protocolo de estresse por rato intruso quando comparados ao grupo controle. A figura 10A apresenta os dados obtidos pelas imagens termais do dorso antes do estresse por rato intruso (Basal), após os 15 minutos da injeção dos tratamentos de acordo com cada grupo (Basal'), durante os 20 minutos de estresse e nos 10 minutos finais de recuperação, em intervalos de 2 minutos.

Observamos efeito do tempo [$F(16,96) = 4,587$; $p < 0,0001$], efeito do tratamento [$F(3,18) = 3,939$; $p = 0,0253$] e também na interação tempo x tratamento [$F(48,28) = 1,848$; $p = 0,0012$] por meio da análise Two-way ANOVA. O pós-teste de Fisher evidenciou que os betabloqueadores foram capazes de reduzir a temperatura do dorso durante todo o experimento a partir da administração das drogas ($p < 0,05$). Na avaliação da temperatura de cauda (figura 10B), o ANOVA de dois fatores também revelou significância nos parâmetros tempo [$F(16,96) = 13,14$; $p < 0,0001$] e tratamento [$F(3,18) = 3,801$; $p = 0,0285$], além da interação tempo x droga [$F(48,28) = 1,784$; $p = 0,0022$]. Ambos betabloqueadores demonstraram diminuir a temperatura de cauda durante o teste de estresse por rato intruso e recuperação ($p < 0,05$).

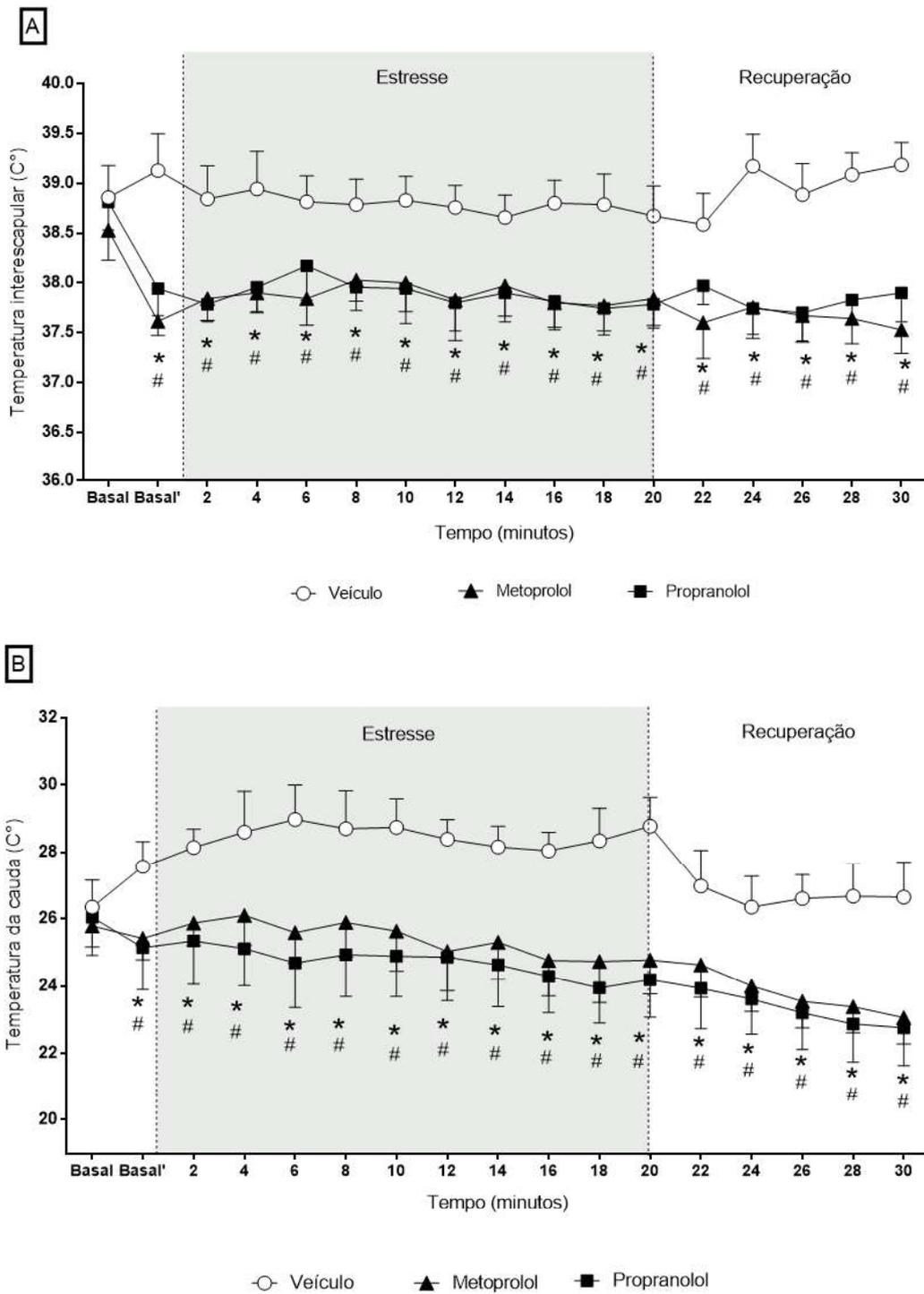


Figura 10 - Influência dos tratamentos na temperatura corporal de ratos expostos a estresse por rato intruso. (A) Alterações na temperatura interescapular evocadas pelo modelo de rato intruso. (B) Alterações na temperatura de cauda evocadas pelo modelo de rato intruso. *Diferença significativa do grupo propranolol em relação ao grupo veículo controle. #Diferença significativa do grupo metoprolol

em relação ao grupo veículo controle. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$. Análise feita por ANOVA Two-way, seguida de pós-teste de Fisher. N=7.

5.3 Propranolol aumentou atividade locomotora no CA

Na avaliação de atividade locomotora dos animais no CA, observamos comportamento exploratório mais intenso para o grupo tratado com propranolol em relação ao controle. O mesmo não foi observado para o grupo metoprolol. Na figura 11, os dados foram expressos pelo número total de quadrantes percorridos durante os 5 minutos de exposição ao CA.

O teste ANOVA de um fator demonstrou efeito significativo para o tratamento [$F(3,28) = 6,713$; $p = 0,0015$]. O pós-teste LSD de Fisher evidenciou o aumento significativo da locomoção no grupo PROP ($p = 0,0138$) mas não demonstrou diferença significativa para MET ($p = 0,9929$) quando comparados ao grupo veículo controle.

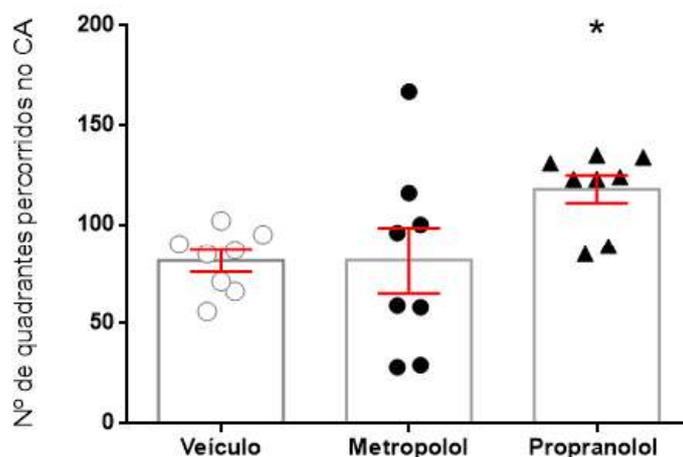


Figura 11 - Influência dos tratamentos na locomoção de ratos expostos ao CA por 5 minutos. *Diferença estatística do grupo propranolol em relação ao grupo veículo controle. Anova one-way, com pós teste Fisher ($p < 0,05$). Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$. Análise feita por ANOVA Two-way, seguida de pós-teste de Fisher. N=8.

5.4 Betabloqueadores diminuem temperatura do dorso durante exposição no CA

Ambos betabloqueadores controlaram o aumento de temperatura interescapular durante exposição ao CA sem afetar temperatura de cauda. Na Figura 12, foram representadas as alterações na temperatura da região interescapular (dorso) e temperatura de cauda durante os 5 minutos da exposição dos animais no CA. O “Basal” na linha do tempo representa os valores de temperatura antes da injeção dos tratamentos, o tempo “0” representa o registro termográfico após os 15 minutos da injeção, tempo que antecedeu a inserção dos animais no CA. Em sequência, são apresentados os valores de temperatura para cada minuto da exposição dos animais no aparato (minuto 1-5).

Nota-se que para todos os tratamentos houve aumento da temperatura do dorso após o tratamento, sugerindo um efeito estressor da manipulação nos animais, apesar de todos os cuidados terem sido tomados para evitar esse estresse. Mas neste ponto, nenhum dos tratamentos foi significativo em relação ao controle pela análise ANOVA de dois fatores com pós-teste de Fisher (p metoprolol = 0,6716; p propranolol = 0,1074).

Já a partir do primeiro minuto no CA, o grupo tratado com propranolol demonstrou redução significativa na temperatura interescapular em relação ao grupo tratado com veículo salina 0,9% ($p = 0,0014$) pela análise Two-way ANOVA com pós-teste de Fisher. Este efeito se estendeu até o último minuto da exposição dos animais ao novo ambiente ($p < 0,05$). Enquanto o tratamento com metoprolol demorou um pouco mais para exercer efeito sobre as respostas térmicas dos animais e apresentou menor duração do efeito, pois apenas diminuiu a temperatura de dorso de forma significativa do segundo ($p = 0,0362$) ao quarto minuto no CA ($p = 0,043$). Nenhum dos betabloqueadores demonstrou alterações significativas na temperatura de cauda em relação ao veículo.

O teste ANOVA de dois fatores não apresentou diferenças significativas na interação entre tempo e tratamentos para temperatura interescapular [$F(18,13) = 0,7723$; $p = 0,7286$] nem para temperatura de cauda [$F(18,20) = 0,3212$; $p = 0,9965$].

Entretanto, apresentou diferenças significativas para os dois parâmetros quando avaliados separadamente. Para temperatura de dorso, o teste Two-way ANOVA mostrou diferenças significativas para variável tempo [F (6,42) = 13,09; p<0,0001] e tratamento [F (3,21) = 3,299; p =0,0404]. Similarmente ao que ocorreu com a temperatura de cauda, em que as duas variáveis também apresentaram diferenças significativas [F (6,20) = 2,160; p= 0,0485] e [F (3,20) = 18,730; p<0,0001] respectivamente.

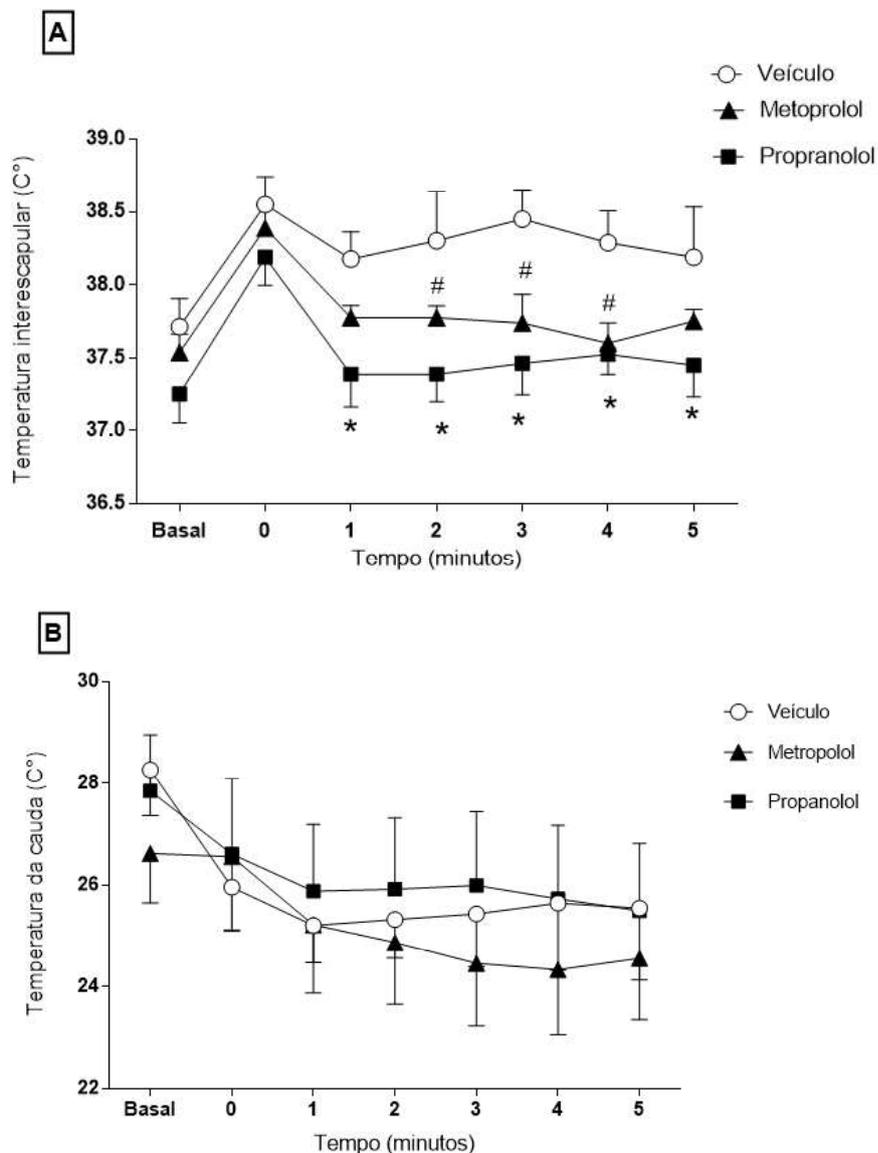


Figura 12 - Influência dos tratamentos na temperatura corporal de ratos durante exposição ao CA. (A) Alterações na temperatura interescapular durante exposição ao CA. *Diferença significativa do grupo

propranolol em relação ao grupo veículo controle. #Diferença significativa do grupo metoprolol em relação ao grupo veículo controle. (B) Alterações na temperatura da cauda durante exposição ao CA. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$. Análise feita por ANOVA Two-way, seguida de pós-teste de Fisher. N=8.

5.5 Betabloqueadores diminuem comportamento do tipo ansiedade na caixa CE

Observamos que ambos betabloqueadores demonstraram redução no comportamento relacionado à ansiedade no aparato CE. Na figura 13, foram representados os dados de exploração dos animais na caixa de transição CE por 5 minutos, em que foram avaliados o número de entradas no claro (A) e o tempo gasto na parte clara da caixa (B).

Foi observado efeito dos tratamentos pela ANOVA One-way no número de vezes que o animal entrou a parte clara [$F(3,26) = 7,045$; $p = 0,0013$] mas não pelo tempo de permanência no compartimento [$F(3,28) = 2,677$; $p = 0,0663$]. Tanto para o tratamento com metoprolol quanto para propranolol, o pós-teste de Fisher evidenciou diferenças significativas para o aumento do número de entradas no claro ($p = 0,0085$ e $p = 0,0065$, respectivamente) em relação ao grupo controle. O metoprolol, além de aumentar o número de entradas no claro, também contribuiu para maior tempo de permanência dos animais no compartimento ($p = 0,0353$), como ilustra a figura 13B.

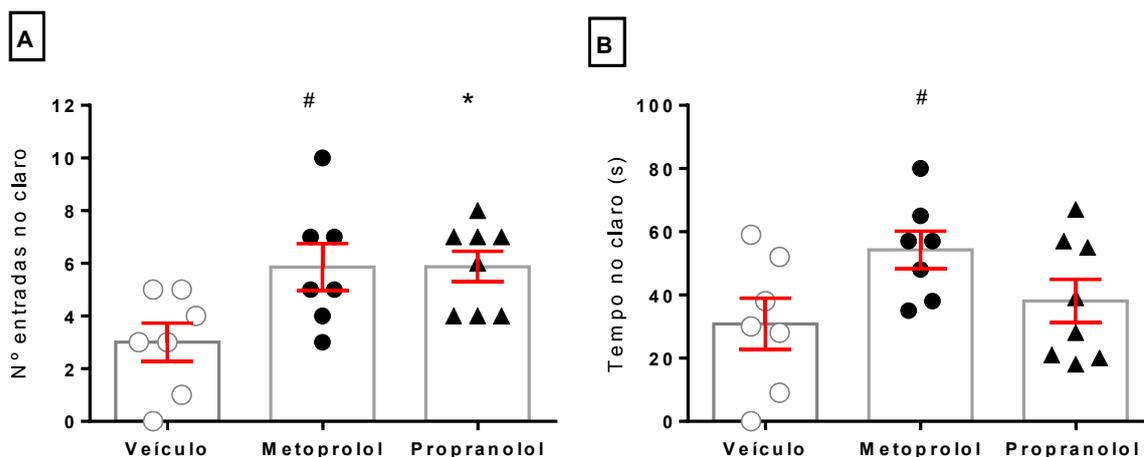


Figura 13 - Influência dos tratamentos na exploração da caixa CE durante 5 minutos. (A) Número de entradas no compartimento claro. *Diferença significativa do grupo propranolol em relação ao grupo veículo controle. #Diferença significativa do grupo metoprolol em relação ao grupo veículo controle. (B) Tempo de permanência no compartimento claro. #Diferença significativa do grupo metoprolol em relação ao grupo veículo controle. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$. Análise feita por ANOVA One-way, seguida de pós-teste de Fisher. N= 8.

5.6 Betabloqueadores não alteraram interação social após estresse

Não observamos efeito de nenhum dos betabloqueadores na ansiedade social dos animais após estresse. O teste ANOVA One-way não foi capaz de evidenciar uma diferença significativa nos grupos MET ($p=0,8685$) nem PROP ($p=0,4422$) em relação ao controle no número de interações com co-específico durante 5 minutos (Figura 14A). Em relação à duração dessas interações, o mesmo foi observado (Figura 14B) sendo que MET ($p=0,3497$) nem PROP ($p=0,6268$) apresentaram diferenças em relação ao controle.

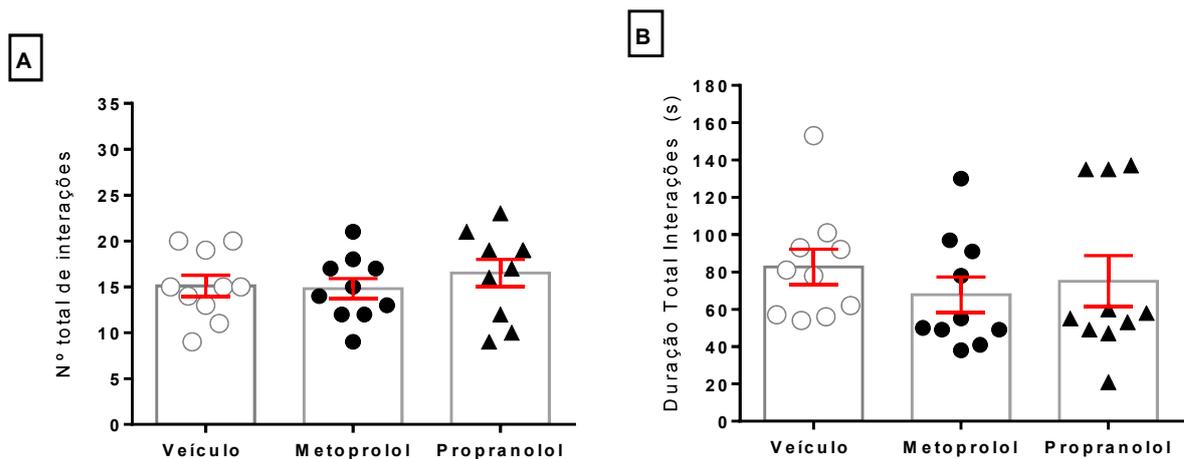


Figura 14 - Influência dos tratamentos na interação social de ratos. (A) Número total de interações durante 5 minutos. (B) Tempo total de interação social durante 5 minutos. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$. Análise feita por ANOVA One-way, seguida de pós-teste de Fisher. N= 10.

5.7 Propranolol diminuiu temperatura de dorso e cauda após estresse e durante interação social

No estresse social por rato intruso seguido de IS, observou-se uma redução da temperatura de dorso e cauda do grupo PROP em relação ao veículo salina, entretanto, não observamos influência do MET nesses parâmetros. A figura 15A apresenta as medidas obtidas da temperatura da região interescapular dos animais submetidos aos testes sociais. No eixo x do gráfico, o “basal” representa os valores de temperatura após o tratamento, enquanto a barra preta representa a exposição ao estresse por um rato intruso durante 15 minutos. Os valores de temperatura apresentados para o estresse são referentes à média dos dois primeiros (início) e dois últimos minutos (fim) do teste. O tempo zero representa o registro após recuperação e antes da inserção dos animais no CA, enquanto o intervalo de 1-5 minutos indica os valores térmicos registrados durante o período de interação social.

Os resultados do teste Two-way ANOVA mostraram diferenças significativas para a variável tempo [$F(8,72) = 3,154$; $p = 0,0041$], mas não foi significativo para o tratamento nem para a interação de tempo x tratamento. O pós-teste de Fisher

evidenciou redução significativa nas temperaturas da região interescapular entre os grupos PROP e veículo ($p < 0,05$) em todos os tempos, exceto no início do paradigma de rato intruso. Tal efeito não foi observado para o grupo tratado com metoprolol em nenhum dos tempos avaliados ($p > 0,05$).

Os parâmetros registrados para temperatura de cauda foram representados na figura 15B, a partir da mesma escala temporal descrita anteriormente. Apenas para a variável tempo o teste ANOVA de dois fatores apresentou diferença significativa [$F(8,72) = 16,60$; $p < 0,0001$]. E similar ao efeito observado na temperatura de dorso, o PROP também foi capaz de reduzir significativamente a temperatura da cauda dos animais a partir do fim do estresse por rato intruso ($p = 0,0092$) até o último minuto da IS ($p = 0,0046$). Já na comparação controle x MET, não observamos influência do metoprolol na temperatura de cauda em nenhum dos tempos avaliados.

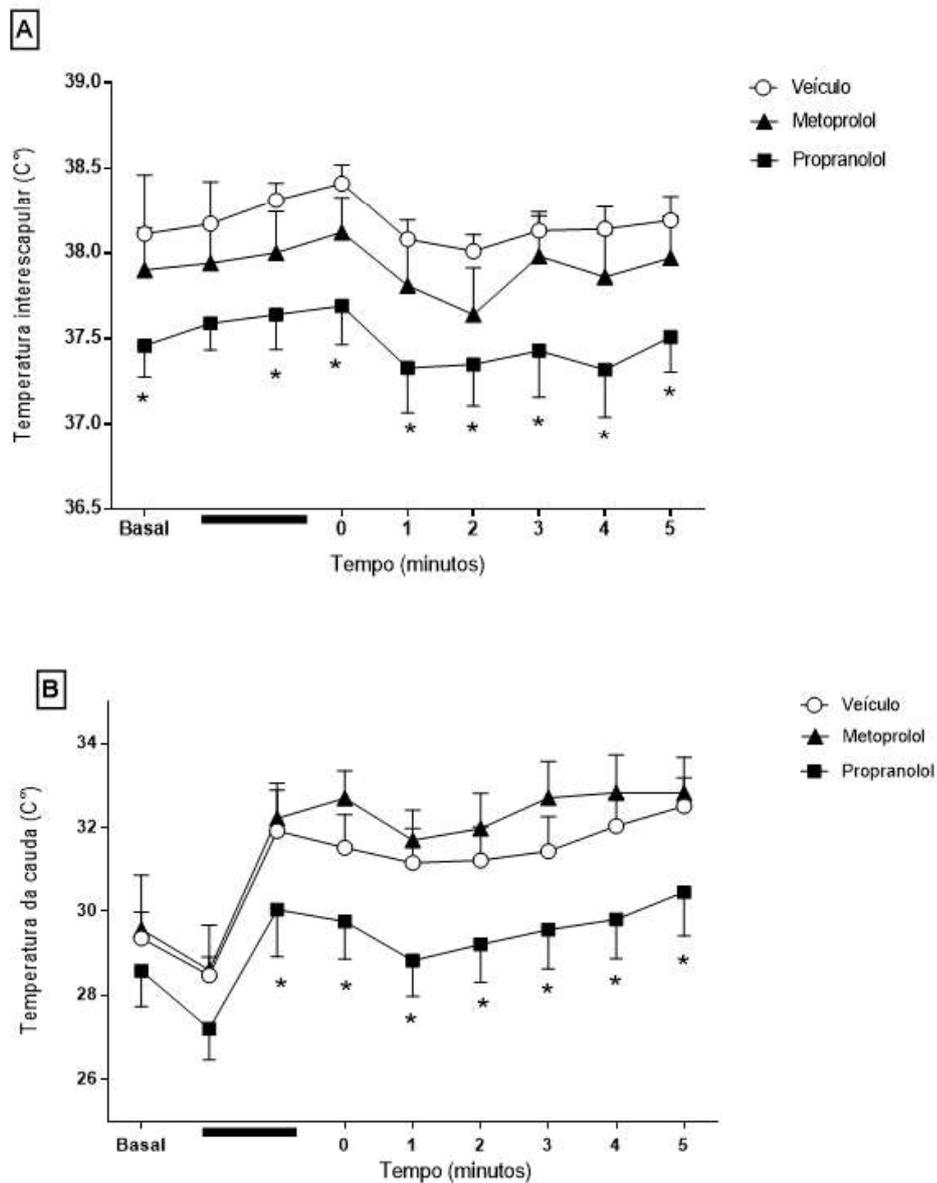


Figura 15 - Influência dos tratamentos na temperatura de ratos expostos a estresse por rato intruso seguido de interação social no CA. (A) Temperatura interescapular. *Diferença significativa do grupo propranolol em relação ao grupo veículo controle. (B) Temperatura da cauda. *Diferença significativa do grupo propranolol em relação ao grupo veículo controle. Valores expressos em média \pm EPM, considerando o nível de significância $p < 0,05$. Análise feita por ANOVA Two-way, seguida de pós-teste de Fisher. N= 10.

6 DISCUSSÃO

Demonstramos em nosso estudo, que tanto propranolol quanto metoprolol a 5 mg/kg (i.p) foram eficientes em reduzir FC dos animais após 15 minutos de tratamento, assim como controlar o parâmetro durante e após estresse, como esperado. O MET exerceu pouca influência sobre PAM enquanto PROP gerou aumento da PAM mesmo antes da exposição ao evento estressor, evidenciando um efeito indesejado resultante do bloqueio não seletivo dos receptores beta-adrenérgicos. Nos testes comportamentais, observamos supressão do comportamento relacionado à ansiedade no CE para ambos betabloqueadores, além do aumento de atividade locomotora no CA para o PROP, mas não foi observada alteração significativa na IS em nenhum dos grupos. Em relação à termorregulação, constatamos que o PROP foi eficiente em reduzir a temperatura interescapular em diferentes situações (estresse por rato intruso, CA, IS) e com exceção do teste no CA, observamos este efeito também na temperatura de cauda. Já o MET reduziu ambas temperaturas no protocolo de estresse por rato intruso, e controlou parcialmente o aumento da temperatura dorsal no CA (2-4 minutos), mas não reduziu a hipertermia durante IS. Esses dados sugerem que PROP exerce melhor controle sobre a temperatura corporal de ratos durante situações potencialmente estressoras.

O efeito positivo que ambos betabloqueadores apresentaram no controle da FC em comparação ao controle, evidencia o bloqueio efetivo da ação das catecolaminas nos receptores β_1 (Gorre e Vandekerckhove, 2010; Zhang et al., 2018). Ao mesmo tempo, o antagonista beta-adrenérgico cardiosseletivo foi capaz de reduzir a PAM nos minutos finais do estresse por rato intruso e durante parte do tempo de recuperação após estresse. Apesar do controle de PAM por MET não ter sido tão expressivo em nossos experimentos, outros pesquisadores demonstraram que a administração aguda do medicamento na dose de 4mg/kg controlou o aumento de PAM e FC de ratos durante 30 minutos de estresse por imobilização (Ishikura et. al., 2012). Resultados similares também foram observados em estudos com humanos (Haria; Plosker; Markham, 2000; Zhang et al., 2018).

Evidências sugerem que o bloqueio dos receptores β_1 adrenérgicos regula a pressão arterial por meio de três vias principais (Li et al., 2014). Inicialmente (ou principalmente) a queda da pressão arterial pode ser explicada pela diminuição do débito cardíaco (Cruickshank, 2007; Li et al., 2014). O MET também inibe a liberação de renina pelas células justaglomerulares, e por consequência, limita a formação de angiotensina II e a vasoconstrição. Além disso, atua centralmente bloqueando os receptores β_1 pré-sinápticos, reduzindo a liberação de norepinefrina (Berg, 2014; Berg; Piercey; Jensen, 2010; Li et al., 2014).

Em contraste com a leve ação hipotensora do MET, nosso estudo demonstrou que o bloqueio não seletivo dos receptores beta-adrenérgicos pelo PROP causou elevação da PAM. Este efeito pode ser principalmente atribuído ao bloqueio dos receptores β_2 periféricos, os quais são conhecidos por estarem associados aos efeitos adversos do medicamento (Cruickshank, 2007; Eren et Al., 2018; Zhou et Al., 2014; Oliver; Mayor Jr; D'ocon, 2019). É sabido que a ação de agentes não seletivos dos receptores β_2 da musculatura lisa pulmonar pode causar constrição dos brônquios, levando ao estreitamento das vias respiratórias e desencadeando ou agravando os sintomas de broncoespasmo em indivíduos de risco (Pathak; Mrabeti, 2021). De maneira semelhante, o aumento da resistência vascular sistêmica é principalmente associado aos betabloqueadores não cardiosseletivos (Bosco e Braz, 2001). Foi demonstrado, ainda, que um antagonista beta-adrenérgico altamente seletivo para os receptores β_2 aumentou a pressão arterial de ratos cerca de 7,5 mmHg (Ignarro, 2004).

Nossos resultados também corroboram com estudos anteriores que demonstraram que a administração de PROP em voluntários saudáveis aumentou a pressão arterial durante o tabagismo, enquanto tal efeito não foi observado após bloqueio β_1 seletivo nem em grupos controle (Trap-Jensen *et al.*, 1979). Podemos relacionar nossos resultados com os observados em tal estudo uma vez que a nicotina, assim como o estresse, estimula a liberação de catecolaminas pelo sistema nervoso simpático (Haass e Kubler, 1997; Liu *et al.*, 2022). Sabe-se que o estresse estimula a liberação de noradrenalina e adrenalina pelo SNS, causando vasodilatação

via β_2 , e vasoconstrição via receptores alfa-adrenérgicos. (Gorre e Vandekerckhove, 2010; Zhang *et al.*, 2018). Ao bloquear os receptores β_2 , PROP possivelmente desestabiliza o equilíbrio entre vasodilatação e vasoconstrição, e como consequência, é possível observar um predominante efeito pressor alfa-adrenérgico nos vasos periféricos. Somado a isso, a ligação inespecífica do PROP aos receptores β_1 diminui a capacidade do coração de compensar o aumento da resistência vascular periférica (Trap-Jensen *et al.*, 1979; Cruickshank, 2007), o que poderia explicar a elevação da PAM observada em nosso estudo.

Na avaliação comportamental, observamos maior número de entradas no compartimento claro da caixa CE além de comportamento exploratório mais intenso no CA para o grupo tratado com propranolol. Enquanto o grupo metoprolol aumentou concomitantemente número de entradas e tempo de permanência no claro sem alterar a atividade locomotora. A atividade locomotora de roedores pode ser relacionada à ansiedade considerando que a exposição a um novo ambiente, a princípio, é levemente ameaçadora aos animais (Hall, 1938; Chirico *et al.*, 2018). Este parâmetro é amplamente utilizado no meio científico para elucidação dos efeitos de medicamentos ansiolíticos no comportamento de animais (Manar *et al.*, 1998). Contudo, os aparatos que envolvem compartimentos CE e os testes de interação social são considerados modelos mais sensíveis e de maior especificidade farmacológica que o CA, pois abrangem ao máximo as tendências exploratórias naturais dos roedores (Ramos *et al.*, 2008, Cardoso *et al.*, 2023).

Considerando que o CE é mais sensível que o CA, podemos inferir que ambos medicamentos demonstram possível redução do comportamento relacionado à ansiedade em nosso estudo. É sabido que animais ansiosos geralmente exploram menos a parte clara da caixa CE enquanto animais menos ansiosos tendem a entrar mais vezes no claro, assim como permanecer mais tempo nele (Campos-Cardoso *et al.*, 2023). Nossos resultados sugerem efeito ansiolítico dos betabloqueadores neste teste pois demonstraram que os grupos PROP e MET entraram mais vezes na parte clara da caixa, além disso os animais que receberam MET também permaneceram mais tempo no claro em comparação com o grupo controle. Embora o mecanismo

exato de ação dos betabloqueadores na modulação do comportamento ansioso ainda não esteja completamente esclarecido, sugere-se que a resposta de ansiedade e estresse possa ser inibida pelo bloqueio da atividade do SNS (O'Connor; Thayer; Vedhara, 2021).

Alguns pesquisadores acreditam que em humanos, a percepção dos sintomas físicos da ansiedade como a taquicardia ou tremor pode desencadear uma resposta de ansiedade adicional, criando um ciclo auto sustentável (Brantigan *et al.*, 1982; Brewer, 1972; Clark e Agras, 1991; Drew *et al.*, 1985; Elman *et al.*, 1998). Assim, foi sugerido que ao bloquear os efeitos periféricos da ansiedade, esses medicamentos aliviam o desconforto físico e a percepção de ameaça, reduzindo o estado de alerta e a ansiedade associada (Ernst *et al.*, 2016). Outros estudos demonstraram ainda que o aumento da FC por um agonista adrenérgico sem efeito no SNC, foi capaz de evocar comportamento ansioso (Hassanpour *et al.*, 2018) demonstrando que a via de sinalização inversa (do coração para o cérebro) também desempenha um papel no comportamento emocional.

Interessantemente, descobertas recentes de Hsueh e colegas (2023) confirmaram a hipótese de que o aumento da frequência cardíaca por si só, contribui diretamente para comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos. Os autores desenvolveram um marcapasso óptico não invasivo capaz de gerar aumento dos batimentos cardíacos ao ser estimulado por luz vermelha. Isso por sua vez, ativou o córtex insular posterior e o tronco cerebral, resultando em comportamento ansioso (Hsueh *et al.*, 2023). Dessa forma, podemos sugerir que ao reduzir FC, os betabloqueadores utilizados em nosso estudo foram capazes de atenuar o comportamento relacionado à ansiedade.

Outros estudiosos, entretanto, demonstraram evidências de que além das conhecidas ações periféricas, os betabloqueadores também atuam a nível do SNC, nos circuitos neuronais envolvendo o córtex pré-frontal e a amígdala basolateral (Abraham *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2014; Steenen *et al.*, 2016). Conhecidamente, estas são regiões envolvidas na regulação da ansiedade e comportamentos sociais tanto em humanos quanto em ratos (Ledoux, 2003; Felix-Ortiz *et al.*, 2016). Foi

demonstrado que os subtipos de adrenocetores $\beta 1$ e $\beta 2$ são expressos de forma heterogénea no cérebro de mamíferos (Gambarana et al., 1991; Ordway, O'Donnell e Frazer, 1987; Rainbow, Parsons e Wolfe, 1984; Silberman, Ariwodola e Weiner, 2012) e embora a distribuição não seja bem estabelecida, é provável que o $\beta 1$ seja predominante em relação ao $\beta 2$ (Rainbow et al., 1984; Abraham et al., 2008). Além disso, evidências sugerem que os $\beta 1$ possuem uma maior afinidade pela noradrenalina em comparação com os $\beta 2$ (Molinoff, 1984; Wallukat, 2002). Portanto, sugerimos que o efeito ansiolítico de ambos betabloqueadores observado em nosso estudo possivelmente está majoritariamente relacionado com o bloqueio dos receptores $\beta 1$, tanto a nível periférico (reduzindo FC) quanto central. Para confirmação da ação de PROP e MET a nível do SNC, posteriormente será realizada análise imuno-histoquímica dos cortes de tecido cerebral para quantificação da proteína c-fos, cuja expressão, segundo Mesquita e colaboradores (2016), é um indicativo de aumento da atividade neuronal nas regiões envolvidas no comportamento do tipo ansiedade.

Embora nossos resultados sugiram que os betabloqueadores podem ser eficazes em sintomas como hiperatividade e medo de ambientes novos ou desconhecidos, não observamos influência das drogas na sociabilidade dos animais. Similarmente aos nossos achados, Kausche e colaboradores concluíram que o PROP não afetou o desenvolvimento de medo social após estresse agudo em indivíduos saudáveis (Kausche et al., 2021). Em outro estudo realizado com 16 pacientes ambulatoriais socialmente fóbicos, os grupos de tratamento com PROP e placebo também mostraram resultados muito semelhantes entre si (Falloon; Lloyd; Harpin, 1981). Pobbe e colegas, por sua vez, investigaram os efeitos da administração aguda e crônica de um antidepressivo no perfil social de ratos. Os resultados apontaram que apenas a administração crônica do antidepressivo interrompeu a resposta ao estresse social e aumentou a sociabilidade dos ratos (Pobbe et al., 2010). Dessa forma, supomos que o tratamento agudo com betabloqueadores não seja capaz de alterar o perfil social dos animais.

Além dos parâmetros cardiovasculares e comportamentais, avaliamos as respostas termorregulatórias dos animais durante diferentes situações potencialmente estressoras, assim como os efeitos do bloqueio seletivo (β_1) e não seletivo (β_1 e β_3) dos principais receptores β -adrenérgicos presentes no TAM. Observamos que durante o protocolo de estresse por rato intruso ambos beta-antagonistas controlaram a hipertermia por estresse reduzindo tanto a temperatura interescapular quanto a temperatura de cauda. No CA ambos reduziram apenas T_{dorso} em relação ao grupo veículo sendo a ação do propranolol levemente superior ao metoprolol, em que T_{dorso} se manteve estável durante os 5 minutos do teste. Em tais protocolos, o controle da temperatura corporal diante do bloqueio seletivo ou não seletivo dos receptores não foi muito distinto, não sendo possível distinguir se a resposta se deveu ao antagonismo em β_1 ou β_3 . Finalmente, quando os animais foram submetidos ao estresse social seguido de interação social, apenas o grupo tratado com propranolol demonstrou controle da temperatura durante o estresse. Esses resultados sugerem que o bloqueio não seletivo dos beta-receptores envolvidos na termogênese é superior ao bloqueio β_1 -seletivo, dado que o controle da hipertermia por estresse pelo propranolol foi repetidamente observado nos diferentes contextos experimentais.

Apesar de estudos atribuírem a estimulação da termogênese no TAM quase exclusivamente aos receptores β_3 -adrenérgicos (Zhao; Cannon; Nedergaard, 1998), há evidências que suportam o envolvimento expressivo dos receptores β_1 (Atgié; D'allaire; Bukowiecki, 1997; Ueta et al., 2012; Harrell *et al.*, 2015). Em um desses estudos também foi discutido o aparente paradoxo referente a participação destes β -receptores na resposta termogênica, pois embora menos abundantes no TAM, o receptor β_1 possui maior afinidade pela noradrenalina que os receptores β_3 (Atgié; D'allaire; Bukowiecki, 1997). Nesse contexto, foi sugerido que os receptores β_1 devem ser responsáveis pela estimulação da termogênese sob condições de estimulação fisiológica leve a moderada (Galitzky *et al.*, 1995) uma vez que em baixas concentrações de NE, a interação com o receptor mais sensível seria favorecida. Em concordância com estas suposições, estudos concluíram que o bloqueio seletivo em β_1 pode inibir quase totalmente os efeitos termogênicos evocados por baixas concentrações de NE, mas perde a significância durante estresse intenso, o qual está

associado a liberação de altas doses de NE nos terminais simpáticos que inervam o TAM (Atgié; D'allaire; Bukowiecki, 1997).

Nossos resultados vão de encontro com tais achados uma vez que o metoprolol foi eficiente em reduzir a temperatura corporal quando os animais foram expostos ao aparato de CA ou estresse por rato intruso de forma dissociada, mas não foi capaz de controlar o parâmetro após estresse repetido. No modelo comportamental em que foram combinados dois estímulos sociais provavelmente houve uma maior liberação de NE no TAM, e o bloqueio seletivo em β_1 não foi eficiente, sugerindo que os receptores β_3 coordenaram a hipertermia por estresse em tal situação. De fato, outros estudos também demonstraram que diante de um bloqueio seletivo em β_1 , os mecanismos de aumento da lipólise e geração de calor no TAM foram mediados pelas vias β_3 -adrenérgicas (Mohell & Dicker, 1989; Zhao; Cannon; Nedergaard, 1998). Em harmonia com esses resultados, demonstramos que no estímulo mais estressante de nosso estudo apenas o bloqueio não seletivo dos receptores (PROP) foi capaz de controlar a hipertermia por estresse. Dessa forma, nossos resultados apontam envolvimento de ambos receptores beta-adrenérgicos na manutenção da homeostase térmica durante situações emocionalmente desafiadoras.

Paralelamente à interação do metoprolol e propranolol com os receptores periféricos envolvidos na regulação da termogênese no TAM, os efeitos observados também podem ser mediados centralmente. Postulados anteriores indicaram que medicamentos com propriedades ansiolíticas podem influenciar a temperatura corporal basal e/ou final de animais, controlando a hipertermia causada pelo estresse (Oka, 2015; Oka e Hori, 2001; Olivier *et al.*, 2003). Como discutido anteriormente, ambos betabloqueadores utilizados em nosso estudo demonstraram potencial efeito ansiolítico, e redução da ansiedade e estresse durante os protocolos experimentais também pode ter contribuído para uma redução na temperatura corporal dos animais.

É importante ressaltar que as vias noradrenérgicas e adrenérgicas abordadas em nosso estudo fazem parte de um complexo sistema que coordena as respostas fisiológicas e comportamentais durante estresse e ansiedade. Embora o bloqueio

dessas vias forneça informações importantes, a fisiopatologia e tratamento dessas condições não devem ser resumidas a elas.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados sugerem que o metoprolol pode ser uma alternativa mais segura que o propranolol para o tratamento de ansiedade situacional e estresse agudo visto que está associado a menor efeito colateral. Além disso, evidenciamos a importância da utilização de diferentes modelos experimentais para uma compreensão mais abrangente dos efeitos de uma droga.

Apesar de o propranolol demonstrar melhores efeitos em relação a atividade motora e hipertermia durante estresse mais intenso, não foi superior ao metoprolol nas respostas de ansiedade na caixa CE, interação social ou hipertermia durante eventos estressantes mais brandos. Portanto, o bloqueio seletivo do receptor β -adrenérgico do subtipo β_1 com metoprolol mostra-se promissor. Tais efeitos possivelmente são alcançados devido à predominante expressão de β_1 no sistema nervoso central e maior sensibilidade à descarga noradrenérgica nesses receptores em comparação aos subtipos β_2 e β_3 .

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, P. A. *et al.* β 1- and β 2-adrenoceptor induced synaptic facilitation in rat basolateral amygdala. **Brain Research**, v. 1209, p. 65–73, maio 2008.

ABREU, A. R. *et al.* Blunted GABA-mediated inhibition within the dorsomedial hypothalamus potentiates the cardiovascular response to emotional stress in rats fed a high-fat diet. **Neuroscience**, v. 262, p. 21–30, mar. 2014.

ADAMEOVA, A.; ABDELLATIF, Y.; DHALLA, N. S. Role of the excessive amounts of circulating catecholamines and glucocorticoids in stress-induced heart disease. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, n. 7, p. 493–514, jul. 2009.

ADHIKARI, A. Distributed circuits underlying anxiety. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, 1 abr. 2014.

ALLEN, A. J.; LEONARD, H.; SWEDO, S. E. Current Knowledge of Medications for the Treatment of Childhood Anxiety Disorders. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 34, n. 8, p. 976–986, ago. 1995.

ALVES, E. *et al.* Epinephrine increases contextual learning through activation of peripheral β 2-adrenoceptors. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 11, p. 2099–2108, 2 jun. 2016.

AMANO, T. *et al.* The Fear Circuit Revisited: Contributions of the Basal Amygdala Nuclei to Conditioned Fear. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 43, p. 15481–15489, 26 out. 2011.

ANDRADE STRAUSS, C. V. DE; VICENTE, M. A.; ZANGROSSI, H. Activation of 5-HT_{1A} receptors in the rat basolateral amygdala induces both anxiolytic and antipanic-like effects. **Behavioural Brain Research**, v. 246, p. 103–110, jun. 2013.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 4, p. 233–242, dez. 2001a.

_____. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 4, p. 233–242, dez. 2001b.

ATGIÉ, C.; D'ALLAIRE, F.; BUKOWIECKI, L. J. Role of β_1 - and β_3 -adrenoceptors in the regulation of lipolysis and thermogenesis in rat brown adipocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 273, n. 4, p. C1136–C1142, 1 out. 1997.

BABOL, K.; BŁASIAK, J. [Beta3-adrenergic receptor]. **Postepy biochemii**, v. 51, n. 1, p. 80–7, 2005.

BANDELOW, B. *et al.* Efficacy of treatments for anxiety disorders. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 30, n. 4, p. 183–192, jul. 2015.

BARBAS, H.; GARCÍA-CABEZAS, M. Á. How the prefrontal executive got its stripes. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 40, p. 125–134, out. 2016.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1–2, p. 141–149, nov. 2001.

BERG, T. Beta-Blockers Lower Norepinephrine Release by Inhibiting Presynaptic, Facilitating Alfa-Adrenoceptors in Normotensive and Hypertensive Rats. **Frontiers in Neurology**, v. 5, 16 abr. 2014.

BERG, T.; PIERCEY, B. W.; JENSEN, J. Role of β_1 – β_3 -Adrenoceptors in Blood Pressure Control at Rest and During Tyramine-Induced Norepinephrine Release in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 55, n. 5, p. 1224–1230, maio 2010.

BERRIDGE, C. W. Noradrenergic modulation of arousal. **Brain Research Reviews**, v. 58, n. 1, p. 1–17, jun. 2008.

BERRIDGE, C. W.; WATERHOUSE, B. D. The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. **Brain Research Reviews**, v. 42, n. 1, p. 33–84, abr. 2003.

BJÖRKQVIST, K. Social defeat as a stressor in humans. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 3, p. 435–442, jun. 2001.

BOSCO, F. A. P.; BRAZ, J. R. C. Beta-bloqueadores em anestesiologia: aspectos farmacológicos e clínicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 51, n. 5, p. 431–447, out. 2001.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 55–65, fev. 2003.

BOYCE, T. G. *et al.* The Use of β -Adrenergic Receptor Antagonists in Psychiatry: A Review. **Journal of the Academy of Consultation-Liaison Psychiatry**, v. 62, n. 4, p. 404–412, jul. 2021.

BRANTIGAN, C. O.; BRANTIGAN, T. A.; JOSEPH, N. Effect of beta blockade and beta stimulation on stage fright. **The American Journal of Medicine**, v. 72, n. 1, p. 88–94, jan. 1982.

BREWER, C. BENEFICIAL EFFECT OF BETA-ADRENERGIC BLOCKADE ON “EXAM. NERVES”. **The Lancet**, v. 300, n. 7774, p. 435, ago. 1972.

BRODDE, O.-E. β -1 and β -2 adrenoceptor polymorphisms: Functional importance, impact on cardiovascular diseases and drug responses. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, n. 1, p. 1–29, jan. 2008.

CALHOON, G. G.; TYE, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1394–1404, 25 out. 2015a.

_____. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1394–1404, 25 out. 2015b.

CALKOSIŃSKI, I. *et al.* The Use of Infrared Thermography as a Rapid, Quantitative, and Noninvasive Method for Evaluation of Inflammation Response in Different Anatomical Regions of Rats. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

CAMPOS, G. V. *et al.* Estrogen receptor β activation within dorsal raphe nucleus reverses anxiety-like behavior induced by food restriction in female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 357–358, p. 57–64, jan. 2019.

CAMPOS-CARDOSO, R. *et al.* Exploring the light/dark box test: Protocols and implications for neuroscience research. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 384, p. 109748, jan. 2023.

CARLSON, J. M. *et al.* Feeling anxious: anticipatory amygdalo-insular response predicts the feeling of anxious anticipation. **Social Cognitive and Affective Neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 74–81, 1 jan. 2011a.

_____. Feeling anxious: anticipatory amygdalo-insular response predicts the feeling of anxious anticipation. **Social Cognitive and Affective Neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 74–81, 1 jan. 2011b.

CARNOVALE, C. *et al.* Antihypertensive drugs and brain function: mechanisms underlying therapeutically beneficial and harmful neuropsychiatric effects. **Cardiovascular Research**, v. 119, n. 3, p. 647–667, 2 maio 2023.

CASTILLO, A. R. G. *et al.* Transtornos de ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. suppl 2, p. 20–23, dez. 2000.

CHATURVEDI, S. K. Propranolol versus Metoprolol in Anxiety Disorders. **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 32, n. 3, p. 250–251, 1 abr. 1987.

CHEN, C. C.; WILLIAMS, C. L. Interactions between epinephrine, ascending vagal fibers, and central noradrenergic systems in modulating memory for emotionally arousing events. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, 2012.

CHÍRICO, M. T. T. *et al.* Tobacco-Free Cigarette Smoke Exposure Induces Anxiety and Panic-Related Behaviours in Male Wistar Rats. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4943, 21 mar. 2018.

CLARK, D. B.; AGRAS, W. S. The assessment and treatment of performance anxiety in musicians. **American Journal of Psychiatry**, v. 148, n. 5, p. 598–605, maio 1991.

CRUICKSHANK, J. M. Are we misunderstanding beta-blockers. **International Journal of Cardiology**, v. 120, n. 1, p. 10–27, ago. 2007.

DREW, P.; BARNES, J.; EVANS, S. The effect of acute beta-adrenoceptor blockade on examination performance. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 19, n. 6, p. 783–786, jun. 1985.

EIDEN, L. E. Neuropeptide–Catecholamine Interactions in Stress. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 399–404.

____. Neuropeptide–Catecholamine Interactions in Stress. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 399–404.

ELMAN, M. J. *et al.* The effect of propranolol versus placebo on resident surgical performance. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 96, p. 283–91; discussion 291-4, 1998.

EREN, H. *et al.* Investigation the effect of propranolol, metoprolol and carvedilol on spermatogenesis in rat testis. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 1082, 28 mar. 2018.

ERNST, M. *et al.* The effects of methylphenidate and propranolol on the interplay between induced-anxiety and working memory. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 19–20, p. 3565–3574, 5 out. 2016.

ESLER, M. Mental stress and human cardiovascular disease. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 74, p. 269–276, mar. 2017.

ESLINGER, P. J. *et al.* The neuroscience of social feelings: mechanisms of adaptive social functioning. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 128, p. 592–620, set. 2021.

FALLOON, I. R. H.; LLOYD, G. G.; HARPIN, R. E. The Treatment of Social Phobia. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 169, n. 3, p. 180–184, mar. 1981.

FELIX-ORTIZ, A. C. *et al.* Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex. **Neuroscience**, v. 321, p. 197–209, maio 2016.

FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 35–53, fev. 2003.

FOGARI, R.; ZOPPI, A. Effect of Antihypertensive Agents on Quality of Life in the Elderly. **Drugs & Aging**, v. 21, n. 6, p. 377–393, 2004.

FRIEDRICH, A. C. D.; MACEDO, F.; REIS, A. H. Vulnerabilidade ao stress em adultos jovens. **Revista Psicologia Organizações e Trabalho**, v. 15, n. 1, p. 59–70, 2015.

GALITZKY, J. *et al.* Differential activation of β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenoceptors by catecholamines in white and brown adipocytes. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 324–331, 8 jul. 1995.

GAMBARANA, C. *et al.* Central administration of 1-isoproterenol in vivo induces a preferential regulation of β_2 -adrenoceptors in the central nervous system of the rat. **Brain Research**, v. 555, n. 1, p. 141–148, jul. 1991.

GOLDSTEIN, D. S. *et al.* Relationship between plasma norepinephrine and sympathetic neural activity. **Hypertension**, v. 5, n. 4, p. 552–559, jul. 1983.

GORRE, F.; VANDEKERCKHOVE, H. Beta-blockers: focus on mechanism of action Which beta-blocker, when and why? **Acta Cardiologica**, v. 65, n. 5, p. 565–570, 23 out. 2010.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 239–259, maio 2004.

GRILLON, C. *et al.* Acute Stress Potentiates Anxiety in Humans. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 10, p. 1183–1186, nov. 2007.

GROSSEN, N. E.; KELLEY, M. J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 81, n. 2, p. 307–310, 1972.

GRUPE, D. W.; NITSCHKE, J. B. Uncertainty and anticipation in anxiety: an integrated neurobiological and psychological perspective. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 7, p. 488–501, 20 jul. 2013.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385–403, dez. 1934.

HARA, M. R. *et al.* Pharmacological blockade of a β_2 AR- β -arrestin-1 signaling cascade prevents the accumulation of DNA damage in a behavioral stress model. **Cell Cycle**, v. 12, n. 2, p. 219–224, 15 jan. 2013.

HARIA, M.; PLOSKER, G. L.; MARKHAM, A. Felodipine/Metoprolol. **Drugs**, v. 59, n. 1, p. 141–157, jan. 2000.

HARRELL, R. *et al.* The effects of the β_1 antagonist, metoprolol, on methamphetamine-induced changes in core temperature in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 609, p. 81–86, nov. 2015.

HASSANPOUR, M. S. *et al.* The Insular Cortex Dynamically Maps Changes in Cardiorespiratory Interoception. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 2, p. 426–434, 9 jan. 2018.

HSUEH, B. *et al.* Cardiogenic control of affective behavioural state. **Nature**, v. 615, n. 7951, p. 292–299, 9 mar. 2023.

HU, P. *et al.* New Insights into the Pivotal Role of the Amygdala in Inflammation-Related Depression and Anxiety Disorder. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11076, 21 set. 2022a.

_____. New Insights into the Pivotal Role of the Amygdala in Inflammation-Related Depression and Anxiety Disorder. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11076, 21 set. 2022b.

HUESING, C. *et al.* Organization of sympathetic innervation of interscapular brown adipose tissue in the mouse. **Journal of Comparative Neurology**, v. 530, n. 9, p. 1363–1378, 16 jun. 2022.

IGNARRO, L. Experimental evidences of nitric oxide-dependent vasodilatory activity of nebivolol, a third-generation β -blocker. **Blood Pressure**, v. 13, n. 1, p. 2–16, 8 jan. 2004.

ISHIKURA, F.; TAKANO, Y.; UEYAMA, T. Acute effects of beta-blocker with intrinsic sympathomimetic activity on stress-induced cardiac dysfunction in rats. **Journal of Cardiology**, v. 60, n. 6, p. 470–474, dez. 2012.

JACKSON, E. D. *et al.* Stress Differentially Modulates Fear Conditioning in Healthy Men and Women. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 6, p. 516–522, mar. 2006.

KALLMAN, M. J. Tests for Anxiolytic Activity. *Em*: **Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 1069–1214.

KAUSCHE, F. M. *et al.* Acute stress leaves fear generalization in healthy individuals intact. **Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 372–389, 24 abr. 2021.

KAWASHIMA, T. The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution. **Anatomy and Embryology**, v. 209, n. 6, p. 425–438, 11 jul. 2005.

KEENEY, A. *et al.* Differential Effects of Acute and Chronic Social Defeat Stress on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function and Hippocampal Serotonin Release in Mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, n. 5, p. 330–338, maio 2006.

KENWOOD, M. M.; KALIN, N. H.; BARBAS, H. Correction: The prefrontal cortex, pathological anxiety, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 47, n. 5, p. 1141–1141, 2 abr. 2022.

LEDOUX, J. The emotional brain, fear, and the amygdala. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, n. 4/5, p. 727–738, 2003.

LENHARDT, G.; CALVETTI, P. Ü. Quando a ansiedade vira doença?: Como tratar transtornos ansiosos sob a perspectiva cognitivo-comportamental. **Aletheia**, v. 50, n. 1–2, p. 111–122, 2017.

LI, Y. *et al.* Metoprolol Restores Expression and Vasodilatation Function of AT2R in Spontaneously Hypertensive Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 252–258, mar. 2014.

LIMA GIACOBBO, B. **Social stress: the good, the bad, and the neurotrophic factor: understanding the brain through PET imaging and molecular biology.** [s.l.] University of Groningen, 4 nov. 2019.

LIMA, P. M. A. *et al.* The role of peripheral transient receptor potential vanilloid 1 channels in stress-induced hyperthermia in rats subjected to an anxiogenic environment. **Journal of Thermal Biology**, v. 106, p. 103191, maio 2022.

LIU, H. H.; MILGROM, P.; FISET, L. Effect of a Beta-adrenergic Blocking Agent on Dental Anxiety. **Journal of Dental Research**, v. 70, n. 9, p. 1306–1308, 8 set. 1991.

LUKAS, M. *et al.* Oxytocin mediates rodent social memory within the lateral septum and the medial amygdala depending on the relevance of the social stimulus: Male juvenile versus female adult conspecifics. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 6, p. 916–926, jun. 2013.

LUNDBERG, U. Catecholamines. *Em*: **Encyclopedia of Stress**. [s.l.] Elsevier, 2007. p. 419–423.

LUO, F. *et al.* Reduction of glutamate release probability and the number of releasable vesicles are required for suppression of glutamatergic transmission by β 1-adrenoceptors in the medial prefrontal cortex. **Neuropharmacology**, v. 83, p. 89–98, ago. 2014.

LYNN, D. Pharmacological treatment of combat-induced PTSD: a literature review. **British Journal of Nursing**, v. 19, n. 5, p. 318–321, 12 mar. 2010.

MACIEL, Caio Fernando; LIMA, Maria Hortência Albuquerque; SOUSA, Joubert Aires. Estudo Comparativo Entre Os Ansiolíticos Diazepam E Buspirona Em Mus Musculus/Comparative Study Between Anxiolytics Diazepam And Buspirona In Mus Musculus. **Saúde em Foco**, v. 2, n. 2, p. 49-61, 2015

MAIER, S. F. *et al.* Behavioral control, the medial prefrontal cortex, and resilience. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 397–406, 31 dez. 2006.

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, abr. 2003.

MESQUITA, L. T. *et al.* New insights on amygdala: Basomedial amygdala regulates the physiological response to social novelty. **Neuroscience**, v. 330, p. 181–190, 25 ago. 2016.

MICHALAK, A. *et al.* Diazepam and SL-327 synergistically attenuate anxiety-like behaviours in mice – Possible hippocampal MAPKs specificity. **Neuropharmacology**, v. 180, p. 108302, dez. 2020.

MOBBS, D. *et al.* The ecology of human fear: survival optimization and the nervous system. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, 18 mar. 2015.

MOHAMMED, M.; OOTSUKA, Y.; BLESSING, W. Brown adipose tissue thermogenesis contributes to emotional hyperthermia in a resident rat suddenly confronted with an intruder rat. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 306, n. 6, p. R394–R400, 15 mar. 2014.

MOHELL, N.; DICKER, A. The β -adrenergic radioligand [3H]CGP-12177, generally classified as an antagonist, is a thermogenic agonist in brown adipose tissue. **Biochemical Journal**, v. 261, n. 2, p. 401–405, 15 jul. 1989.

MOLINOFF, P. B. Alpha- and Beta-Adrenergic Receptor Subtypes Properties, Distribution and Regulation. **Drugs**, v. 28, n. Supplement 2, p. 1–15, 1984.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. DE M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, n. suppl 1, p. 24–40, maio 1999.

MOTA-ROJAS DANIEL *et al.* Neurobiología y modulación de la hipertermia inducida por estrés agudo y fiebre en los animales. **Abanico Veterinario**, v. 11, 2 jan. 2021.

MUELLER, B.; FIGUEROA, A.; ROBINSON-PAPP, J. Structural and functional connections between the autonomic nervous system, hypothalamic–pituitary–adrenal axis, and the immune system: a context and time dependent stress response network. **Neurological Sciences**, v. 43, n. 2, p. 951–960, 16 fev. 2022.

MURROUGH, J. W. *et al.* Emerging drugs for the treatment of anxiety. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 20, n. 3, p. 393–406, 3 jul. 2015.

NECHITA, D.; NECHITA, F.; MOTORGA, R. A review of the influence the anxiety exerts on human life. **Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie**, v. 59, n. 4, p. 1045–1051, 2018.

NORONHA, S. R. DE *et al.* High fat diet induced-obesity facilitates anxiety-like behaviors due to GABAergic impairment within the dorsomedial hypothalamus in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 316, p. 38–46, jan. 2017.

O'CONNOR, D. B.; THAYER, J. F.; VEDHARA, K. Stress and Health: A Review of Psychobiological Processes. **Annual Review of Psychology**, v. 72, n. 1, p. 663–688, 4 jan. 2021.

O'DONNELL, J. *et al.* Norepinephrine: A Neuromodulator That Boosts the Function of Multiple Cell Types to Optimize CNS Performance. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 11, p. 2496–2512, 21 nov. 2012.

OKA, T. Psychogenic fever: how psychological stress affects body temperature in the clinical population. **Temperature**, v. 2, n. 3, p. 368–378, 3 jul. 2015.

OKA, T.; OKA, K.; HORI, T. Mechanisms and Mediators of Psychological Stress-Induced Rise in Core Temperature. **Psychosomatic Medicine**, v. 63, n. 3, p. 476–486, maio 2001.

OLIVEIRA, A. *et al.* Epinephrine Released During Traumatic Events May Strengthen Contextual Fear Memory Through Increased Hippocampus mRNA Expression of Nr4a Transcription Factors. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, 25 set. 2018.

OLIVER, E.; MAYOR JR, F.; D'OCÓN, P. Beta-blockers: Historical Perspective and Mechanisms of Action. **Revista Española de Cardiología (English Edition)**, v. 72, n. 10, p. 853–862, out. 2019a.

_____. Beta-blockers: Historical Perspective and Mechanisms of Action. **Revista Española de Cardiología (English Edition)**, v. 72, n. 10, p. 853–862, out. 2019b.

OLIVIER, B. *et al.* Stress-induced hyperthermia and anxiety: pharmacological validation. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 117–132, fev. 2003.

ORDWAY, G. A.; O'DONNELL, J. M.; FRAZER, A. Effects of clenbuterol on central beta-1 and beta-2 adrenergic receptors of the rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 241, n. 1, p. 187–95, abr. 1987.

OTTAVIANI, C. Brain-heart interaction in perseverative cognition. **Psychophysiology**, v. 55, n. 7, jul. 2018.

PATHAK, A.; MRABETI, S. β -Blockade for Patients with Hypertension, Ischemic Heart Disease or Heart Failure: Where are We Now? **Vascular Health and Risk Management**, v. Volume 17, p. 337–348, jun. 2021.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 171–177, fev. 2007.

PICKERING, A. M. *et al.* Oxidative stress adaptation with acute, chronic, and repeated stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 55, p. 109–118, fev. 2013.

POLIT, Denise F.; BECK, Cheryl Tatano. **Fundamentos de Pesquisa em Enfermagem: Avaliação de Evidências para a Prática da Enfermagem**. 7ª Ed. PORTO ALEGRE: Artmed, 2011, 669 p.

RAINBOW, T. C.; PARSONS, B.; WOLFE, B. B. Quantitative autoradiography of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 5, p. 1585–1589, mar. 1984.

RAMOS, A. *et al.* Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. **Behavioural Brain Research**, v. 193, n. 2, p. 277–288, nov. 2008.

REIS, D. G. DOS *et al.* Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. **Stress**, v. 17, n. 4, p. 362–372, 25 jul. 2014.

REIS, T. O. *et al.* Abdominal TRPV1 channel desensitization enhances stress-induced hyperthermia during social stress in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 246, p. 103073, maio 2023.

REPOVA, K. *et al.* Cardiovascular therapeutics: A new potential for anxiety treatment? **Medicinal Research Reviews**, v. 42, n. 3, p. 1202–1245, 6 maio 2022.

RIDDELL, J. G.; HARRON, D. W. G.; SHANKS, R. G. Clinical Pharmacokinetics of beta-Adrenoceptor Antagonists. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 12, n. 5, p. 305–320, maio 1987.

RUAN, Y. *et al.* The Role of Adrenoceptors in the Retina. **Cells**, v. 9, n. 12, p. 2594, 3 dez. 2020.

SANTOS, Á. R. C. *et al.* Thermoregulatory responses, heart rate, and the susceptibility to anxiety in obese animals subjected to stress. **Physiology & Behavior**, v. 266, p. 114181, jul. 2023.

SELYE, H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. **Nature**, v. 138, n. 3479, p. 32–32, jul. 1936.

SHIN, L. M.; LIBERZON, I. The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 169–191, 22 jan. 2010.

SILBERMAN, Y.; ARIWODOLA, O. J.; WEINER, J. L. β 1-Adrenoceptor Activation Is Required for Ethanol Enhancement of Lateral Paracapsular GABAergic Synapses in the Rat Basolateral Amygdala. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 343, n. 2, p. 451–459, nov. 2012.

STEENEN, S. A. *et al.* Propranolol for the treatment of anxiety disorders: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Psychopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 128–139, 20 fev. 2016.

STEINER, H. *et al.* Divalproex Sodium for the Treatment of PTSD and Conduct Disordered Youth: A Pilot Randomized Controlled Clinical Trial. **Child Psychiatry and Human Development**, v. 38, n. 3, p. 183–193, 15 out. 2007.

SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E. Role of neuropeptides in central control of cardiovascular responses to stress. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 59 Suppl 8, p. 61–89, dez. 2008.

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. 231–240, nov. 2006.

TAYLOR, J. *et al.* Effects of buspirone on plasma catecholamines, heart rate, and blood pressure in stressed and nonstressed rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 34, n. 2, p. 349–353, out. 1989.

THIBAUT, F. Anxiety disorders: a review of current literature. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 87–88, 30 jun. 2017.

TOTH, I.; NEUMANN, I. D.; SLATTERY, D. A. Social Fear Conditioning: A Novel and Specific Animal Model to Study Social Anxiety Disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 6, p. 1433–1443, 11 maio 2012.

TOTH, M. *et al.* Impaired conditioned fear response and startle reactivity in epinephrine-deficient mice. **Behavioural Pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 1–9, fev. 2013.

TRAP-JENSEN, J. *et al.* Cardiovascular and adrenergic effects of cigarette smoking during immediate non-selective and selective beta adrenoceptor blockade in humans. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 9, n. 3, p. 181–183, jun. 1979.

TURNER, A. I. *et al.* Psychological stress reactivity and future health and disease outcomes: A systematic review of prospective evidence. **Psychoneuroendocrinology**, v. 114, p. 104599, abr. 2020.

TYE, K. M. *et al.* Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 358–362, 9 mar. 2011.

UETA, C. B. *et al.* β_1 Adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice. **Journal of Endocrinology**, v. 214, n. 3, p. 359–365, set. 2012.

VINKERS, C. H. *et al.* Stress-induced hyperthermia is reduced by rapid-acting anxiolytic drugs independent of injection stress in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 93, n. 4, p. 413–418, out. 2009.

WALLUKAT, G. The β -Adrenergic Receptors. **Herz**, v. 27, n. 7, p. 683–690, 1 nov. 2002.

WANG, Y. *et al.* Monoamine Oxidases Desensitize Intracellular β_1 AR Signaling in Heart Failure. **Circulation Research**, v. 129, n. 10, p. 965–967, 29 out. 2021.

WEARING, O. H. *et al.* Adrenergic control of the cardiovascular system in deer mice native to high altitude. **Current Research in Physiology**, v. 5, p. 83–92, 2022.

WEIR, M. R. β -Blockers in the Treatment of Hypertension: Are There Clinically Relevant Differences? **Postgraduate Medicine**, v. 121, n. 3, p. 90–98, 13 maio 2009.

WILLIAM D. TUCKER; PARVATHY SANKAR; PRAMOD THEETHA KARIYANNA. **Selective Beta-1 Blockers.**

WILLIAM TANK, A.; LEE WONG, D. Peripheral and Central Effects of Circulating Catecholamines. *Em: Comprehensive Physiology*. [s.l.] Wiley, 2014. p. 1–15.

ZAMIGNANI, D. R.; BANACO, R. A. Um Panorama Analítico-Comportamental sobre os Transtornos de Ansiedade. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v. 7, n. 1, p. 77–92, 1 fev. 2005.

ZHANG, H. *et al.* The Role of Beta-Adrenergic Receptors in Depression and Resilience. **Biomedicines**, v. 10, n. 10, p. 2378, 23 set. 2022a.

_____. The Role of Beta-Adrenergic Receptors in Depression and Resilience. **Biomedicines**, v. 10, n. 10, p. 2378, 23 set. 2022b.

ZHANG, Q. *et al.* Dose-independent influence of metoprolol on cardiac and motor functions, QoL, and mental status in Chinese patients with CHF. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. Volume 15, p. 23–31, dez. 2018.

ZHAO, J.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Thermogenesis is β_3 - but not β_1 - adrenergically mediated in rat brown fat cells, even after cold acclimation. **American**

Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 275, n. 6, p. R2002–R2011, 1 dez. 1998.

ZHOU, Y. *et al.* Effect of Long-Term Application of Metoprolol and Propranolol in a Rat Model of Smoking. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, p. n/a-n/a, maio 2014.

ANEXOS

Anexo I



Universidade Federal de Ouro Preto
*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do Propranolol, Metoprolol e Diazepam sobre o sistema nervoso autônomo colinérgico e as respectivas respostas quando submetidos ao teste comportamental campo aberto", protocolada sob o CEUA nº 1667240418 (ID 000096), sob a responsabilidade de **Rodrigo Cunha Alvim de Menezes e equipe; Fernanda Isabel Ferreira; Thayane Oliveira Reis; Milton Alexandre de Paula; Marly de Lourdes Ferreira Lessa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 21/09/2018.

We certify that the proposal "Effects of Propranolol, Metoprolol and Diazepam on the autonomic cholinergic nervous system and the respective responses when submitted to the behavioral test open field ", utilizing 126 Heterogenics rats (126 males), protocol number CEUA 1667240418 (ID 000096), under the responsibility of **Rodrigo Cunha Alvim de Menezes and team; Fernanda Isabel Ferreira; Thayane Oliveira Reis; Milton Alexandre de Paula; Marly de Lourdes Ferreira Lessa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 09/21/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 08/2018 a 08/2021 Área: Ciências Biológicas

Origem: Centro de Ciência Animal

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

Idade: 08 a 10 semanas Quantidade: 126

Linhagem: Wistar

Peso: 250 a 280 g

Ouro Preto, 17 de julho de 2023

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Profa. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto



Anexo II



Universidade Federal de Ouro Preto

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos de betabloqueadores sobre a reatividade cardiovascular e temperatura corporal durante o estresse social em ratos Wistar", protocolada sob o CEUA nº 3931110520 (ID 000631), sob a responsabilidade de **Rodrigo Cunha Alvim de Menezes e equipe; Fernanda Isabel Ferreira; Thayane Oliveira Reis; Máira Tereza Talma Chirico; Milton Alexandre de Paula; Marly de Lourdes Ferreira Lessa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 20/08/2021.

We certify that the proposal "Effects of beta-blockers on cardiovascular reactivity and body temperature during social stress in Wistar rats", utilizing 85 Heterogenics rats (85 males), protocol number CEUA 3931110520 (ID 000631), under the responsibility of **Rodrigo Cunha Alvim de Menezes and team; Fernanda Isabel Ferreira; Thayane Oliveira Reis; Máira Tereza Talma Chirico; Milton Alexandre de Paula; Marly de Lourdes Ferreira Lessa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 08/20/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2020 a 08/2022** Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Centro de Ciência Animal**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **08 a 10 meses**

Quantidade: **85**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **100 a 300 g**

Ouro Preto, 17 de julho de 2023

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Profa. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto



