



**Laura Balthazar de Souza Alves**

**Uso de Anti-hipertensivos na Modulação  
da Ansiedade em Modelos Animais**

**Dissertação de Mestrado**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Psicologia pelo Programa de Pós-Graduação em Psicologia Clínica, na linha de pesquisa Clínica e Neurociências, do Departamento de Psicologia da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Thomas Eichenberg Krahe

Rio de Janeiro  
Março de 2021



**Laura Balthazar de Souza Alves**

## **Uso de Anti-hipertensivos na Modulação da Ansiedade em Modelos Animais**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre pelo  
Programa de Pós-graduação em Psicologia  
(Psicologia Clínica) da PUC-Rio. Aprovada pela  
Comissão Examinadora abaixo:

**Prof. Thomas Eichenberg Krahe**

Orientador

Departamento de Psicologia – PUC-Rio

**Prof. Jesus Landeira-Fernandez**

Departamento de Psicologia – PUC-Rio

**Profa. Carolina Monteiro de Lemos Barbosa**

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Rio de Janeiro, 02 de março de 2021

Todos os direitos reservados. A reprodução, total ou parcial, do trabalho é proibida sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

### **Laura Balthazar de Souza Alves**

Graduou-se em Biomedicina pelo Centro Universitário IBMR, em 2016. Obteve grau de Especialista em Neurociência Pedagógica, pela AVM Educacional, em 2019. Obteve grau de Mestre em Psicologia Clínica pela PUC-Rio, em 2021.

#### Ficha Catalográfica

Alves, Laura Balthazar de Souza

Uso de anti-hipertensivos na modulação da ansiedade em modelos animais / Laura Balthazar de Souza Alves ; orientador: Thomas Eichenberg Krahe. – 2021.

81 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)—Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Psicologia, 2021.

Inclui bibliografia

1. Psicologia - Teses. 2. Ansiedade. 3. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. 4. Sistema renina-angiotensina. 5. Losartana. 6. Valsartana. I. Krahe, Thomas Eichenberg. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Psicologia. III. Título.

CDD: 150

Dedico este trabalho a Deus, minha família e meus amigos, pelo apoio e companheirismo durante cada momento dessa jornada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus. Por seu Amor incondicional. Sem Ele, nada disso seria possível (Rm 8:37-39).

Aos meus pais e meu irmão, vocês são a minha base. Agradeço por toda a minha família. Obrigada por todo o apoio e amor, sempre acreditando em mim (e nas minhas loucuras!).

Aos meus amigos, minha segunda família. Obrigada por estarem presentes em todos os momentos, pelas palavras de conforto, ânimo e incentivo. Sou muito grata por poder compartilhar a vida com vocês!

À PUC-Rio, pela oportunidade de me permitir crescer tanto profissionalmente, como pessoalmente.

Agradeço por todos os professores e pessoas que tive a honra e o privilégio de conhecer durante esse período do mestrado.

Ao meu orientador, prof. Thomas. Obrigada por todos os ensinamentos e pelos puxões de orelha! Agradeço por ter sido sua aluna e pela sua amizade.

Ao prof. Jesus Landeira-Fernandez, pelo apoio durante todo esse projeto.

À Silvia e Flávia, por todos os ensinamentos que me deram. Obrigada pela disposição e suporte, sempre presentes. Vocês são maravilhosas!

Ao André, por sempre me ajudar a trabalhar na minha paciência. Obrigada por todo o auxílio durante meus experimentos e pelos momentos descontraídos!

Ao Yury, pela parceria, disponibilidade e ajuda durante a conclusão dessa etapa. Você é um anjo!

Agradeço aos alunos de Iniciação Científica, pela companhia e apoio na execução das tarefas e experimentos do laboratório.

Agradeço à Carolina Barbosa, minha orientadora na época da faculdade. Graças a você e tudo o que me ensinou, nasceu a ideia desse projeto de mestrado!

E, em especial, ao Victor Romano. O amigo que ganhei de presente durante esse mestrado. Agradeço pelo companheirismo, ombro presente e pelas muitas (muitas mesmo) gargalhadas compartilhadas!

Muito obrigada a todos vocês!

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

## RESUMO

Alves, Laura Balthazar de Souza; Krahe, Thomas Eichenberg. **Uso de Anti-hipertensivos na Modulação da Ansiedade em Modelos Animais.** Rio de Janeiro, 2021. 81p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Os transtornos de ansiedade afetam milhares de pessoas em todo o mundo, sendo representados como um dos principais distúrbios mentais. A ansiedade é acompanhada por uma série de respostas comportamentais e fisiológicas, quando na presença de estímulos aversivos. Essas respostas provocam ações neuroendócrinas envolvendo o sistema nervoso simpático (SNS), o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o sistema renina-angiotensina (SRA). Pesquisas feitas em modelos animais possibilitam uma melhor compreensão dos mecanismos neurofisiológicos e comportamentais associados à patologias observadas em humanos. Os animais Cariocas com Alto Congelamento (CAC) e Cariocas com Baixo Congelamento (CBC) são duas linhagens condicionadas de ratos que apresentam, respectivamente, níveis altos ou baixos de respostas semelhantes à ansiedade. O presente estudo investigou os efeitos da Losartana e Valsartana, sendo ambas da classe antagonistas do receptor de angiotensina II, na modulação da ansiedade nos ratos CAC, CBC e ratos controle. O tratamento crônico com Losartana e o tratamento agudo com Valsartana não produziram efeitos significativos nas respostas comportamentais associadas à ansiedade no condicionamento de medo contextual, campo aberto e labirinto em cruz elevado. Nossos dados sugerem que nas doses e duração dos tratamentos, a administração destes medicamentos anti-hipertensivos não é capaz de modular a ansiedade nos animais CAC e CBC.

## Palavras-chave

Ansiedade; eixo hipotálamo-pituitária-adrenal; sistema renina-angiotensina; losartana; valsartana.

## ABSTRACT

Alves, Laura Balthazar de Souza; Krahe, Thomas Eichenberg (Advisor). **Effects of Antihypertensives on Anxiety-like Behaviors in Animal Models.** Rio de Janeiro, 2021. 81p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Psicologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Anxiety disorders affect thousands of people all around the world, being represented as the most common of mental disorders. Anxiety is associated with a number of behavioral and physiological responses when faced with aversive stimuli. These responses provoke neuroendocrine actions involving the activation of the sympathetic nervous system (SNS), the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) and the renin-angiotensin system (RAS). Studies on animal models allow for a better understanding of the neurophysiological and behavioral mechanisms associated with pathologies observed in humans. The Carioca High Freezing (CHF) and Carioca Low Freezing (CLF) are two conditioned strains of rats that present, respectively, high or low levels of anxiety-like responses. The present study investigated the effects of Losartan and Valsartan, both angiotensin II receptor blockers, on the modulation of anxiety-like behaviors of CHF, CLF and control rats. Neither chronic treatment of Losartan nor acute treatment of Valsartan yielded significant effects on anxiety measurements in the contextual fear conditioning, open field and elevated plus maze tests. Thus, our findings suggest that at the doses and durations of treatment tested, administration of these antihypertensive drugs did not play a modulating role of anxiety-like behaviors in CHF and CLF animals.

## Keywords

Anxiety; hypothalamic-pituitary-adrenal axis; renin-angiotensin system; losartan; valsartan.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1. Modelos Animais de Ansiedade .....	12
1.2. Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) .....	13
1.3. Sistema Renina-Angiotensina (SRA) .....	15
1.4. Relação do eixo HPA com o SRA .....	18
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
3.1. Experimento 1 – Tratamento Crônico .....	22
3.1.1. Animais .....	22
3.1.2. Cirurgia de Minibomba Osmótica .....	22
3.1.3. Drogas .....	23
3.2. Experimento 2 – Tratamento Agudo .....	23
3.2.1. Animais .....	23
3.2.2. Drogas .....	23
3.3. Testes Comportamentais .....	24
3.3.1. Condicionamento de Medo Contextual .....	24
3.3.2. Campo Aberto .....	25
3.3.3. Labirinto em Cruz Elevado .....	26
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>27</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
5.1. Experimento 1 – Tratamento Crônico .....	28
5.2. Experimento 2 – Tratamento Agudo .....	32
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>
<b>9. ANEXO I – ARTIGO .....</b>	<b>56</b>
<b>10. ANEXO II – MATERIAL SUPLEMENTAR (ARTIGO) .....</b>	<b>76</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema representando o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal em ratos .....	<b>14</b>
<b>Figura 2.</b> Esquema representando o sistema renina-angiotensina clássico .....	<b>16</b>
<b>Figura 3.</b> Esquematização do bloqueio da ação dos receptores AT1 pelos Antagonistas do Receptor de Angiotensina II .....	<b>17</b>
<b>Figura 4.</b> Esquematização da comunicação entre o SRA periférico com o SRA central .....	<b>19</b>
<b>Figura 5.</b> Esquematização da relação entre o estresse e ansiedade com o sistema nervoso simpático, SRA e o eixo HPA .....	<b>20</b>
<b>Figura 6.</b> Representação do teste de condicionamento de medo contextual .....	<b>25</b>
<b>Figura 7.</b> Representação do teste de campo aberto .....	<b>25</b>
<b>Figura 8.</b> Representação do teste de labirinto em cruz elevado .....	<b>26</b>
<b>Figura 9.</b> Condicionamento de Medo Contextual – Tratamento Crônico .....	<b>29</b>
<b>Figura 10.</b> Campo Aberto – Tratamento Crônico .....	<b>30</b>
<b>Figura 11.</b> Labirinto em Cruz Elevado – Tratamento Crônico .....	<b>31</b>
<b>Figura 12.</b> Condicionamento de Medo Contextual – Tratamento Agudo .....	<b>33</b>

**Figura 13.** Campo Aberto – Tratamento Agudo ..... 34

**Figura 14.** Labirinto em Cruz Elevado – Tratamento Agudo ..... 35

## INTRODUÇÃO

O transtorno de ansiedade é considerado um dos principais distúrbios mentais do mundo e, de acordo com dados registrados da Organização Mundial de Saúde, o Brasil lidera o ranking mundial de casos de transtornos de ansiedade, abrangendo 9,3% de toda a população (World Health Organization, 2017). Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), a ansiedade é acompanhada de aumento da frequência cardíaca e respiratória, prejuízo na aprendizagem e memória, perda de concentração, inquietação, dentre outros (American Psychiatric Association, 2014). Quando esses sintomas se tornam recorrentes e persistentes, ocorrendo por no mínimo 6 meses, caracteriza-se um quadro clínico de Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) (American Psychiatric Association, 2014). A TAG é um distúrbio seguido de preocupações excessivas, irritabilidade e nervosismo, perturbação do sono, resposta de sobressalto exagerada, tensão muscular, entre outros (American Psychiatric Association, 2014; Leonardo & Hen, 2006).

A ansiedade é caracterizada por um estado emocional comportamental, ocorrendo diante de situações vistas como aversivas e estressantes (Clément et al., 2002; Ramos & Mormède, 1998). Na presença de estímulos considerados ameaçadores, o organismo rapidamente inicia o processo de alostase (McEwen, 2007). Com isso, são geradas respostas de defesa adaptativas com o intuito de preservar seu equilíbrio interno, desencadeando reações fisiológicas, neuroendócrinas e psicológicas (Clément et al., 2002; Faravelli et al., 2012). Dentre essas respostas adaptativas, destaca-se a ativação do sistema nervoso simpático (SNS), que é o mediador da resposta de “luta ou fuga” (Fink, 2017; Yaribeygi & Sahraei, 2018), motivando a liberação de catecolaminas, aumento dos batimentos cardíacos, dilatação das pupilas, e sudorese (Joëls et al., 2012; Koeppen & Stanton, 2017; Lammert & Zeeb, 2014). Além disso, ocorre a ativação e envolvimento do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e do sistema renina-angiotensina (SRA) periférico e central (Charmandari et al., 2005; Fink, 2017).

Os transtornos de ansiedade podem prejudicar a qualidade de vida do paciente, assim como sua rotina diária e trabalho (McEwen & Gianaros, 2010). Além disso, aumenta a necessidade de assistência a serviços de saúde tanto física quanto mental (Roy-Byrne et al., 2008). Diversos estudos clínicos

evidenciaram a existência de uma elevada associação entre um transtorno de ansiedade, com maior prevalência da TAG e a síndrome do pânico, com algumas doenças crônicas (Härter et al., 2003; Roy-Byrne et al., 2008). Doenças gastrointestinais, renais, respiratórias, hipertensão e doenças cardiovasculares são algumas das comorbidades relacionadas com a ansiedade (Jacobson & Cryan, 2009; Roy-Byrne et al., 2008; Sareen et al., 2006).

### 1.1.

## MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE

No decorrer dos anos, laboratórios de pesquisa se dedicaram no desenvolvimento de modelos animais, principalmente camundongos e ratos, que reproduzam sintomas similares aos observados em humanos, com a finalidade de estudar os mecanismos neurais, genéticos e comportamentais de fenótipos relacionados à ansiedade (Clément et al., 2002; Hassan et al., 2013).

Assim como os humanos, os animais também apresentam respostas comportamentais defensivas diante de uma possível ameaça ou estímulo aversivo (Fisch & Flint, 2006; Steimer, 2011). Um dos comportamentos defensivos mais comuns nos ratos, por exemplo, é a resposta de congelamento, caracterizada pela ausência de qualquer movimento visível, além da respiração (Fanselow & Gale, 2003; Gale et al., 2004). Essa resposta pode ser ativada por estímulos naturalmente ameaçadores (reconhecidos de forma inata) ou estímulos de perigo condicionados (adquiridos por processos de aprendizagem) (Landeira-Fernandez et al., 2006). Estudos já relataram que respostas distintas desse congelamento defensivo estão relacionadas com diferentes transtornos de ansiedade (Brandão et al., 2008). O congelamento condicionado ao contexto, associado ao choque nas patas, é considerado um dos modelos que apresenta maior similaridade com a TAG, além de ser o mais utilizado (Blanchard, 2001; Gomes & Landeira-Fernandez, 2008).

Para a obtenção de um bom modelo animal com condições clínicas, é necessário validar pelo menos três critérios, sendo estes: I- validade preditiva, avaliando a sensibilidade do animal aos fármacos agonistas e antagonistas utilizados no campo clínico; II- validade aparente/de face, considerando a semelhança das respostas comportamentais e sintomatologia da condição clínica, entre o animal com o humano; e III- validade de construto, envolvendo

um embasamento teórico lógico sólido (Boulton et al., 1991, pp. 1–20; Clément et al., 2002; Jacobson & Cryan, 2009).

Respeitando esses critérios, o Laboratório de Neurociência Comportamental da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio) desenvolveu duas linhagens condicionadas e fenotipadas de ratos, denominadas Cariocas com Alto Congelamento (CAC) e Cariocas com Baixo Congelamento (CBC). Apresentando, respectivamente, níveis altos ou baixos de congelamento, em resposta ao medo condicionado ao choque elétrico nas patas (Gomes & Landeira-Fernandez, 2008).

O protocolo experimental segue com o rato sendo colocado em uma câmara fora de seu conhecimento e, após 8 minutos de habituação (período pré-choque), o animal recebe 3 rápidos choques nas patas (0,6 mA por 1s) dentro de um intervalo de 20 segundos, seguindo por mais 2 minutos de observação, sem a presença do choque (período pós-choque) (Cavaliere et al., 2020). Depois de 24 horas (podendo ser também depois de semanas ou meses (Gale et al., 2004)), o animal retorna à câmara, por 8 minutos, e é observada a resposta de congelamento na ausência do estímulo aversivo (Hassan et al., 2013).

A geração das linhagens deu-se pelo acasalamento de machos e fêmeas que apresentaram maiores e menores respostas de congelamento, levando à uma seleção bidirecional com altos e baixos níveis de ansiedade (Gomes & Landeira-Fernandez, 2008). As diferenças entre as linhagens já estavam evidentes após a terceira geração, indicando a existência de fortes características genéticas e o contraste entre as diferenças fenotípicas, de ambos comportamentos (Gomes & Landeira-Fernandez, 2008; Gomes et al., 2013).

Essas linhagens representam um importante papel no estudo de mecanismos neurais e genéticos relacionados à ansiedade, principalmente no caso da TAG, além de auxiliarem na verificação de fármacos com perfis ansiolíticos e/ou ansiogênicos (Hassan et al., 2013; León et al., 2017).

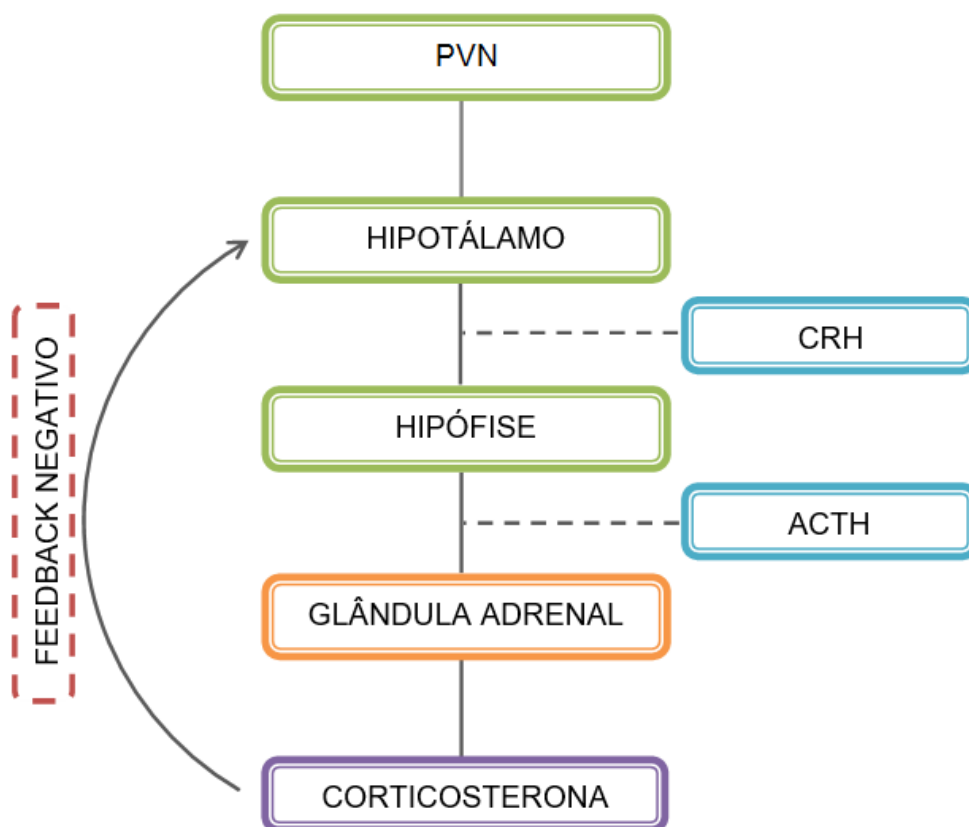
## 1.2.

### EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL (HPA)

Uma das principais respostas neuroendócrinas ao estresse é a ativação do eixo HPA. Neurônios localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo

(PVN) impulsionam o hipotálamo a liberar o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (Graeff & Junior, 2010). Este, por sua vez, estimula a hipófise, que libera o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea. O ACTH circulante atua no córtex das glândulas adrenais, provocando a liberação de glicocorticoides, sendo o cortisol o principal (cortisol em humanos e corticosterona em ratos) (Joëls et al., 2012; Leonard, 2005; Pêgo et al., 2009).

Após o momento de estresse, os glicocorticoides atuam como reguladores do eixo HPA, promovendo um feedback negativo no hipotálamo e hipófise, diminuindo a secreção de CRH e ACTH (Swaab et al., 2005). Essa ação tem como objetivo diminuir os efeitos prejudiciais da exposição prolongada dos glicocorticoides nos tecidos (Aguilera, 2011; Charmandari et al., 2005; Swaab et al., 2005) (**Figura 1**).



**Figura 1.** Esquema representando o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal em ratos. PVN: núcleo paraventricular; CRH: hormônio liberador de corticotrofina; ACTH: hormônio adrenocorticotrófico.

Quando ocorre uma falha no mecanismo de feedback negativo, permanecendo ativado, gera-se uma desregulação da atividade do eixo HPA (Faravelli et al., 2012). Essa hiperativação do eixo resulta em maiores concentrações de glicocorticoides circulantes, prejudicando a resiliência do organismo ao estresse, além de provocar alterações nas respostas imunes, metabólicas e cardiovasculares (Aguilera, 2011; Leonard, 2005).

Estudos prévios realizados com as linhagens de animais Cariocas (CAC e CBC, respectivamente) investigaram a relação entre o transtorno de ansiedade e o eixo HPA, encontrando altos níveis basais de corticosterona nos animais CAC, em comparação ao controle e CBC (Dias et al., 2014; Léon et al., 2013). Isso sugere, então, uma alta atividade desse eixo nos animais mais ansiosos, o que consequentemente irá ocasionar em um aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticoides (Mousovich-Neto et al., 2015).

### 1.3.

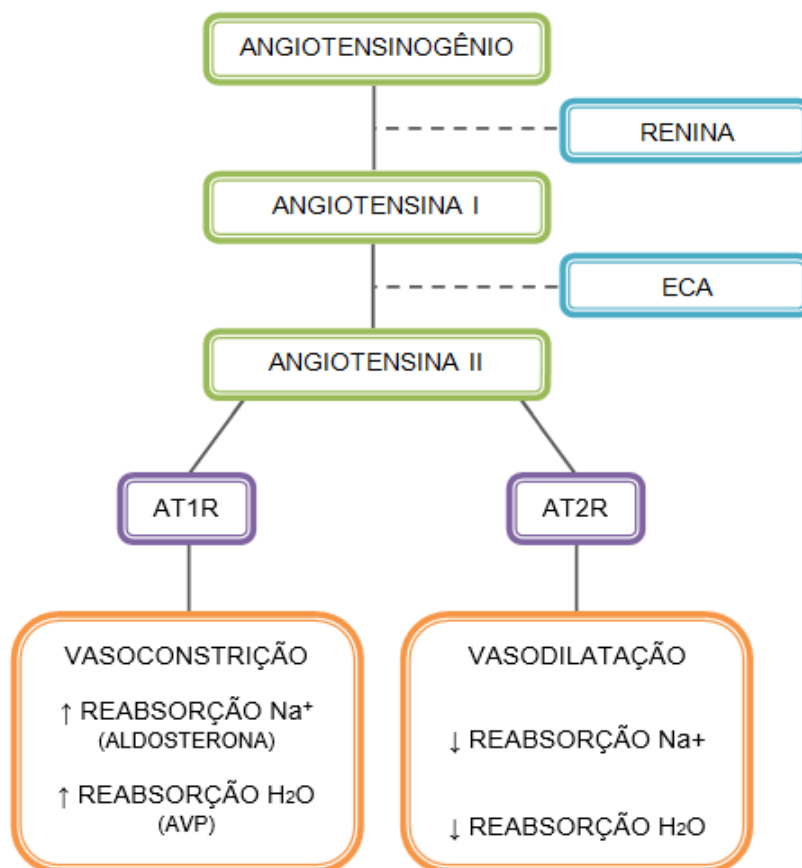
#### **SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)**

O SRA é caracterizado como uma via enzimática complexa, sendo relacionado com importantes funções fisiológicas, principalmente na regulação da pressão arterial (Gard, 2002; Savaskan, 2005). Desempenha papéis em tecidos e órgãos variados, tanto de forma local como sistêmica, atuando no controle da homeostase eletrolítica, vasoconstrição, secreção hormonal, resposta inflamatória, débito cardíaco, entre outros (Forrester et al., 2018; Nehme et al., 2019; Ranjbar et al., 2019).

O sistema clássico se inicia com o angiotensinogênio, originado do fígado, sendo clivado pela renina, enzima produzida pelos rins, em angiotensina I (ANG I) (Aguilera et al., 1995). Pela enzima conversora de angiotensina (ECA), secretada pelos pulmões, a ANG I é convertida em angiotensina II (ANG II) (Aguilera et al., 1995; Nakagawa et al., 2020; Juan M. Saavedra et al., 2005). Sendo esta o principal peptídeo do sistema e considerada o hormônio do estresse (Juan M. Saavedra & Benicky, 2007), encontrada em diferentes tecidos, como coração, rins, cérebro, glândula adrenal, vasos sanguíneos (Gard, 2002; Nehme et al., 2019; J. M. Saavedra et al., 2004).

A ANG II exerce seus efeitos pelos receptores AT1 e AT2, sendo o AT1 seu receptor predominante e responsável pela a maioria das ações do SRA

(Culman et al., 2002; Gard, 2002). As funções dos receptores AT1 e AT2 são opostas, enquanto o AT1 promove a vasoconstrição e retenção de sódio, o AT2 induz a vasodilatação e natriurese, dentre outras (Gross et al., 2000; Nehme et al., 2019) (**Figura 2**).



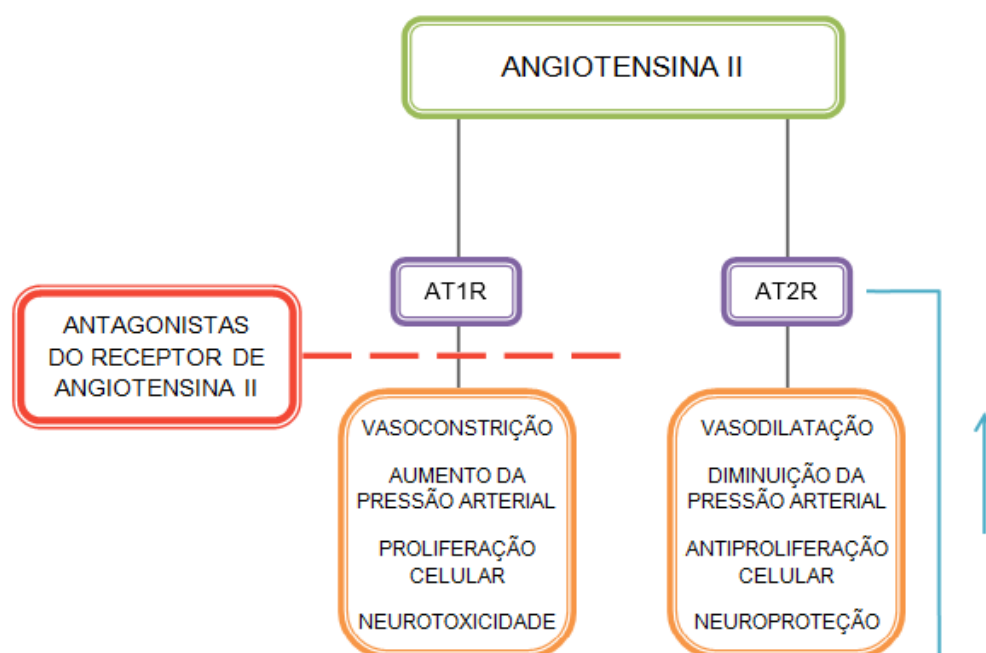
**Figura 2.** Esquema representando o sistema renina-angiotensina clássico. ECA: enzima conversora de angiotensina.

Além disso, o AT1 estimula o córtex adrenal a liberar aldosterona, um importante hormônio responsável pela reabsorção de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e secreção de potássio ( $\text{K}^+$ ) (Patel et al., 2017). Em resposta à osmolaridade plasmática, a aldosterona também estimula a reabsorção de água pela liberação do hormônio vasopressina (AVP), secretado pela hipófise (Bhargava et al., 2004; Koeppen & Stanton, 2017; Patel et al., 2017).

Os medicamentos anti-hipertensivos atuam bloqueando as ações do SRA (Silva et al., 2019), existindo cinco classes diferentes de medicamentos, sendo cada uma com a sua forma de atuação (Khalil & Zeltser, 2020). Uma das classes mais utilizadas clinicamente é a dos Antagonistas do Receptor de Angiotensina II



(ARA) (Juan M. Saavedra et al., 2011). Os ARAs atuam bloqueando de forma competitiva e específica o receptor AT1, inibindo suas ações com a ANG II no SRA periférico e central (J.M. Saavedra, 2017; Juan M. Saavedra et al., 2011). Existem, pelo menos, 8 tipos de fármacos ARA disponíveis clinicamente, como por exemplo a Losartana, Valsartana, Candesartana, entre outras (Ranjbar et al., 2019; Villapol & Saavedra, 2014) (**Figura 3**).



**Figura 3.** Esquematização do bloqueio da ação dos receptores AT1 pelos Antagonistas do Receptor de Angiotensina II.

Apesar das ações do AT2 não serem completamente compreendidas, sabe-se que ele atua contrabalanceando as ações do AT1 (Bader, 2010; Nehme et al., 2019). Considera-se, então, que os efeitos observados pelo uso de um anti-hipertensivo da classe ARA podem ser ocasionados em decorrência do aumento na expressão dos receptores AT2, que irão atuar em favor da manutenção do equilíbrio interno no organismo (Herichova & Szantoova, 2013; Wincewicz & Braszko, 2017).

O SRA pode promover diversas alterações neurofisiológicas quando estiver desregulado, como a hipertensão, processos pró-inflamatórios, ansiedade, estresse oxidativo, lesões cerebrais e até mesmo rompimento da barreira hematoencefálica (BHE) (Farag et al., 2017; Gebre et al., 2018; Gironacci et al., 2018). Diferentes estudos clínicos, realizados em humanos e

animais, demonstraram possíveis efeitos neuroprotetores pelo tratamento crônico ou agudo de um medicamento ARA (Gironacci et al., 2018; Juan M. Saavedra et al., 2011). Algumas das respostas observadas foram a redução do estresse, diminuição de inflamações cerebrais, prevenção de derrames e uma melhora nos casos de demência e comprometimento cognitivo (Baghai et al., 2002; Khoury et al., 2012; Juan M. Saavedra, 2012a).

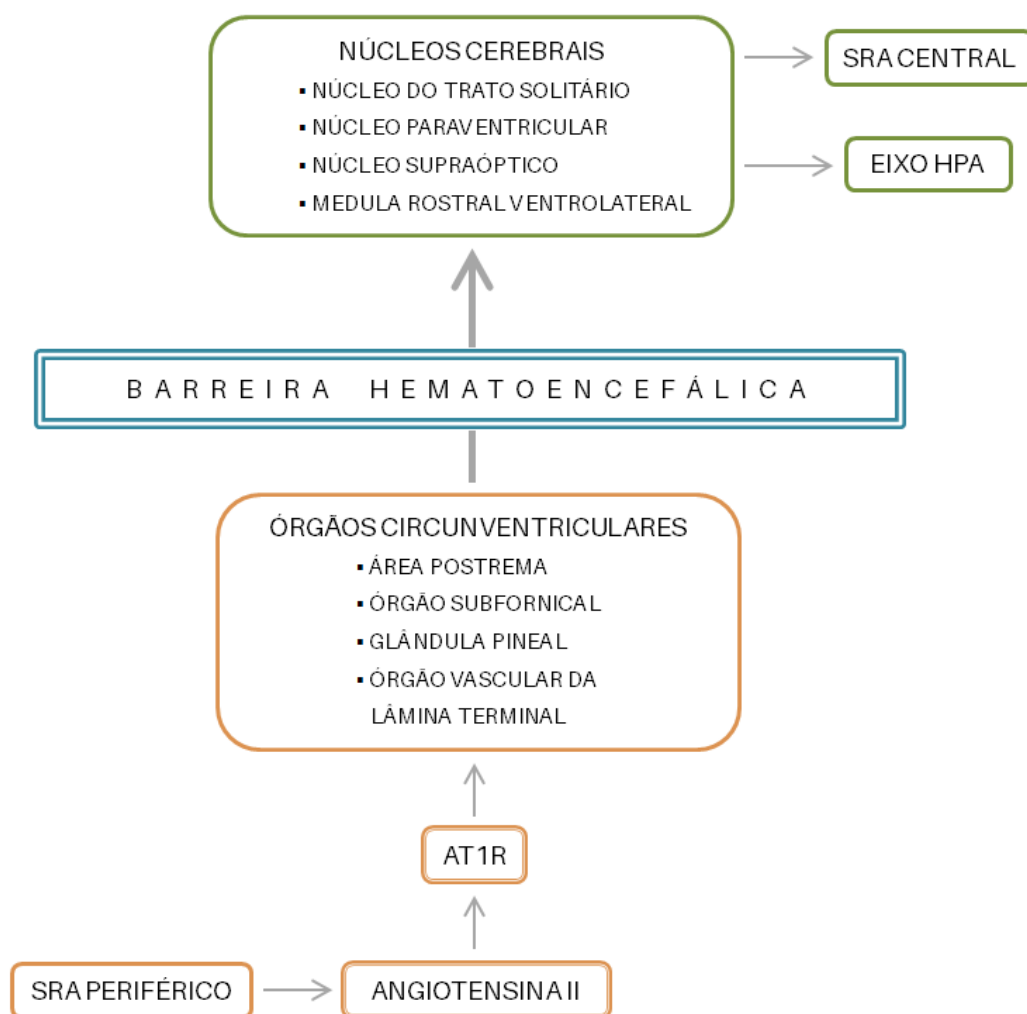
No cérebro, algumas das ações da ANG II e do AT1 são a regulação do balanço eletrolítico e fluxo sanguíneo cerebral, integridade da barreira hematoencefálica (BHE) e manutenção da pressão arterial (McKinley et al., 2003; Nakamura et al., 2014; Juan M. Saavedra, 2012a). Apesar dos receptores AT1 serem distribuídos de forma abundante em diferentes regiões cerebrais, os componentes ativos do SRA não atravessam a BHE (Savaskan, 2005). Desse modo, ocorre uma comunicação direta do SRA periférico com o SRA central, entre os órgãos circunventriculares localizados fora da BHE com os núcleos cerebrais localizados dentro da BHE (Aguilera et al., 1995; Armando et al., 2007; Campos et al., 2017; Leong et al., 2002).

#### 1.4.

### RELAÇÃO DO EIXO HPA COM SRA

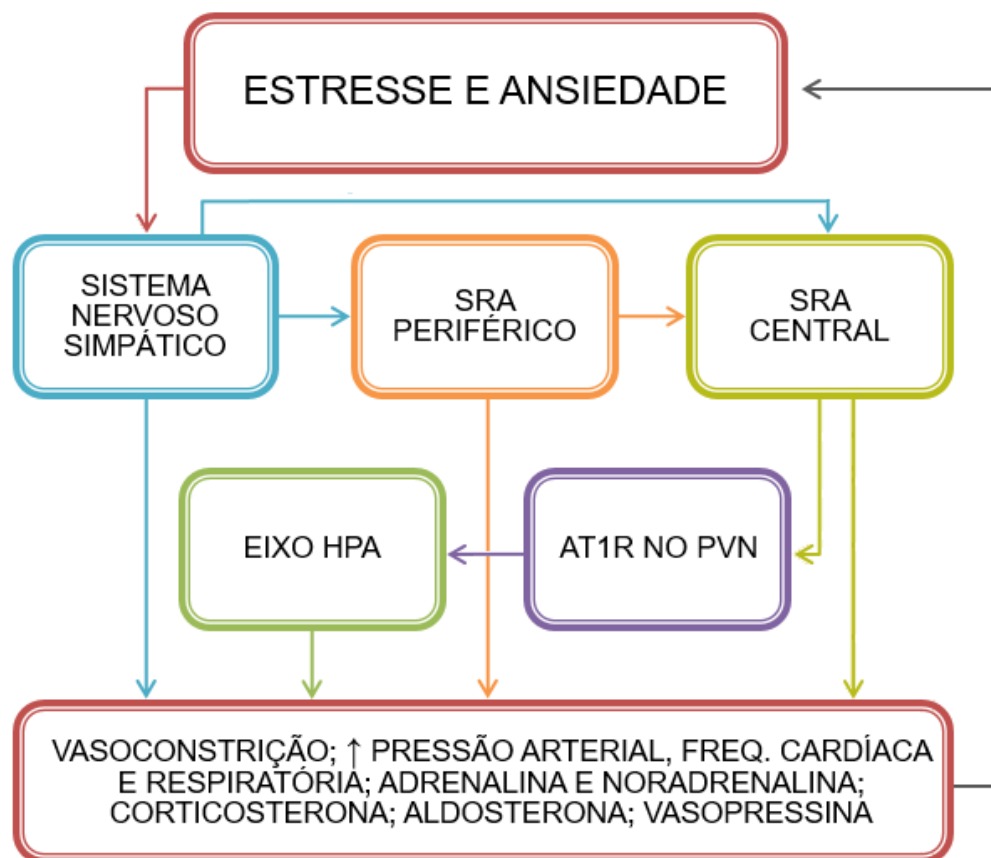
Em resposta ao estresse, os receptores  $\beta$ -adrenérgicos são estimulados pela ativação simpática do SNS, levando ao aumento da produção da renina (Juan M. Saavedra & Benicky, 2007). Consequentemente, a cascata do SRA é ativada, resultando em aumento da ANG II, tanto periférica quanto central, e um aumento da expressão do receptor AT1 em seus tecidos-alvo (Allen et al., 2000; Nakagawa et al., 2020; Juan M. Saavedra & Benicky, 2007).

A ANG II circulante se comunica com seus receptores AT1 situados do lado de fora da BHE, que por sua vez, irão interagir com as regiões cerebrais do lado dentro da BHE, estimulando a ação do SRA central (Campos et al., 2017; Juan M. Saavedra & Benicky, 2007). Nessa circunstância, aumenta-se a expressão do AT1 nas células neurosecretores do PVN (Forrester et al., 2018), sendo este o núcleo cerebral com a maior quantidade de AT1 presente, impulsionando a liberação do CRH e provocando a cascata do eixo HPA (**Figura 4**) (Armando et al., 2001; Forrester et al., 2018; Leong et al., 2002).



**Figura 4.** Esquematização da comunicação entre o SRA periférico com o SRA central. A ativação dos receptores AT1R pelo SRA periférico estimula a ativação dos órgãos circunventriculares que, por sua vez, irão se comunicar e ativar os núcleos cerebrais, ativando o SRA central e o eixo HPA. SRA: sistema renina-angiotensina; HPA: hipotálamo-pituitária-adrenal.

Em casos de estresse constante e transtornos de ansiedade, ocorre uma resposta exacerbada do SRA e eixo HPA, induzindo um ciclo vicioso com a ativação persistente de todos os componentes (**Figura 5**) (Wincewicz & Braszko, 2017).



**Figura 5.** Esquematização da relação entre o estresse e ansiedade com o sistema nervoso simpático, SRA e o eixo HPA. SRA: sistema renina-angiotensina; PVN: núcleo paraventricular; HPA: hipotálamo-pituitária-adrenal.

Esse ciclo descompensa a função fisiológica do organismo, ampliando o risco de desenvolvimento de comorbidades como disfunções cardiovasculares, aumento da pressão arterial, complicações renais, derrames, danos cognitivos, processos inflamatórios por conta dos elevados níveis plasmáticos de glicocorticoides, entre outros (Forrester et al., 2018; Michopoulos et al., 2017; Roy-Byrne et al., 2008; Juan M. Saavedra, 2012b; L. Wang et al., 2016).

Mais detalhes a respeito da relação entre esses dois sistemas podem ser encontrados no **Anexo I – Artigo** (p. 56), sendo este uma revisão sistemática que escrevemos e submetemos para uma revista de conceito A1 da CAPES.

## 2

### OBJETIVOS

#### OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com Losartana e do tratamento agudo com Valsartana na modulação da ansiedade de ratos CAC.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar se a administração crônica ou aguda de bloqueadores do receptor AT1 reduz a resposta de congelamento de ratos CAC no teste de condicionamento de medo contextual.
- 2) Avaliar se a administração crônica ou aguda de bloqueadores do receptor AT1 tem efeito ansiolítico no padrão da atividade locomotora de ratos CAC no teste de campo aberto.
- 3) Avaliar se a administração crônica ou aguda de bloqueadores do receptor AT1 tem efeito ansiolítico no comportamento de ratos CAC no teste de labirinto em cruz elevado (LCE).

### 3

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1.

#### EXPERIMENTO 1 – TRATAMENTO CRÔNICO

##### 3.1.1.

#### ANIMAIS

Foram utilizados 10 ratos CAC, 10 ratos CBC e 10 ratos normais Wistar (controle – CTR) machos (250 g – 360 g) provenientes do biotério do Departamento de Psicologia da PUC-Rio, da 33ª geração. Os animais foram alocados e mantidos em gaiolas de polipropileno, contendo de 2 a 3 animais em cada, com cama de maravalha, água filtrada e ração *ad libitum*, sob condições controladas de temperatura em  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro-escuro de 12 horas (6:00 h – 18:00 h). Todos os experimentos foram realizados de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais de Pesquisa (CEUA 036/2013), em conformidade com as prerrogativas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), baseadas no National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animal (Council, 2011).

##### 3.1.2.

#### CIRURGIA MINIBOMBA OSMÓTICA

Todos os animais foram submetidos à cirurgia de implantação de uma minibomba osmótica (modelo: 2ML4, Alzet, EUA), implantada no tecido subcutâneo, com duração de 25 dias. Para a implantação das minibombas, os animais foram previamente anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina (100 µl/100 g) e xilazina (50 µl/100 g). A cirurgia foi iniciada a partir dos visíveis efeitos da anestesia, sendo a perda de reflexo dos olhos, patas e cauda dos animais. Durante e após a cirurgia os animais foram mantidos aquecidos por uma lâmpada de aquecimento a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , retornando para suas respectivas gaiolas originais somente após terem recuperado completamente seus sentidos. Os

testes comportamentais, em todos os animais, foram realizados no 21º e 22º dia de uso das minibombas osmóticas. A coleta de material biológico foi realizada no 25º dia.

### **3.1.3.**

#### **DROGAS**

O anti-hipertensivo Losartana (Sigma, Brasil) foi solubilizado em solução salina estéril (0,9% NaCl). Os animais receberam um tratamento crônico por um período de 25 dias do fármaco (10 mg/kg/dia – 60 µl/dia) (n = 6 animais por linhagem) (Song et al., 2015; Üresin et al., 2004), ou apenas solução salina 0,9% (n = 4 animais por linhagem).

### **3.2.**

#### **EXPERIMENTO 2 – TRATAMENTO AGUDO**

### **3.2.1.**

#### **ANIMAIS**

Foram utilizados 15 ratos CAC, 12 ratos CBC e 15 ratos normais Wistar (controle – CTR) machos (270g–400 g) provenientes do biotério do Departamento de Psicologia da PUC-Rio, da 34ª geração. As condições de manutenção e manuseio dos animais foram conduzidas de forma semelhante à descrita no item 3.1.1..

### **3.2.2.**

#### **DROGAS**

O anti-hipertensivo Valsartana (Sigma, Brasil) foi solubilizado em DMSO 5% e água destilada (veículo). Os animais receberam dose única, via gavagem (Ciencor, Ref. IC810), do fármaco (40 mg/kg – 10 ml/kg) (CAC, n = 8; CTR, n = 8; CBC. n = 6) (Downie et al., 2008; Gao et al., 2016) ou apenas a solução de

veículo (10 ml/kg) (CAC, n = 7; CTR, n = 7; CBC, n = 6). Os animais receberam o tratamento 2h antes dos testes comportamentais.

### 3.3.

#### TESTES COMPORTAMENTAIS

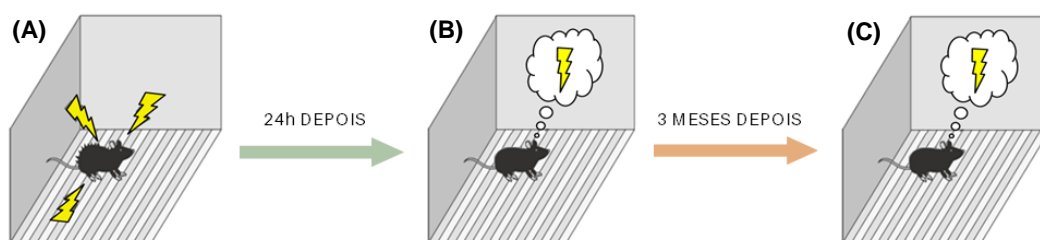
Todos os animais dos experimentos com tratamento crônico e agudo foram submetidos ao teste de condicionamento de medo contextual. No dia seguinte, os animais foram avaliados no teste de campo aberto e em seguida no teste de labirinto em cruz elevado.

#### 3.3.1.

##### CONDICIONAMENTO DE MEDO CONTEXTUAL

O teste de condicionamento de medo contextual foi feito em uma câmara (Coulbourn, 25 cm x 20 cm x 20 cm). No chão da câmara contém 15 barras de aço inoxidável com espaçamento de 1,5 cm, conectadas a um gerador de choque (0,6 mA por 1 segundo) e um codificador (AVS, SCR04; São Paulo). Uma câmera de vídeo foi alocada no teto da câmara, permitindo que o experimentador observasse o comportamento do animal por um monitor localizado fora da sala de experimento. Os animais de todos os grupos foram submetidos ao teste de condicionamento de medo contextual, sem o uso de medicamentos (teste), seguindo de acordo com o protocolo (Gomes & Landeira-Fernandez, 2008). Após 3 meses, os animais foram tratados com os respectivos medicamentos e então novamente testados (reteste) (**Figura 6**). Os animais foram observados a cada 2 segundos por uma experimentadora treinada e capacitada, analisando as respostas de congelamento no medo contextual, caracterizadas pela ausência de movimentos, exceto os respiratórios. Uma solução de hidróxido de amônia (0,2%) foi usada para limpar a câmara, no intervalo entre um animal e outro (Gomes & Landeira-Fernandez, 2008; Hassan et al., 2013).



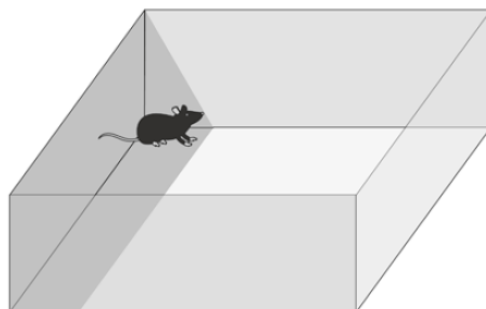


**Figura 6.** Representação do teste de condicionamento de medo contextual. Primeiro dia do animal na câmara, sendo o período de habituação seguido com o rápido choque nas patas **(A)**. Dia do teste, 24h depois, sendo observado apenas o comportamento de congelamento, sem receber o congelamento nas patas **(B)**. Reteste, realizado 3 meses depois do teste, observando a resposta de congelamento, sem receber o choque nas patas **(C)**. Imagens adaptadas (Muir et al., 2019).

### 3.3.2.

#### CAMPO ABERTO

O teste de campo aberto foi realizado em uma caixa de madeira, pintada de preto, medindo 65x60 cm. O chão da caixa é demarcado em 9 quadrantes, sendo 8 relacionados à periferia, ou seja, áreas relacionadas a parede da caixa, e 1 relacionado ao centro da caixa (**Figura 7**). Os animais foram colocados no centro da caixa, dando início ao teste, com duração de 5 minutos. A análise da atividade locomotora de cada animal foi feita pelo programa X-Plo-Rat (versão 3.3.0), contabilizando o número total de passagens na área central e periférica, tempo (s) e porcentagem pelo centro. Uma entrada para qualquer quadrante foi apenas contabilizada quando todas as quatro patas do animal estavam presentes dentro do quadrante. Foi utilizada uma solução de hidróxido de amônia (0,2%) para limpar a caixa, no intervalo entre um animal e outro (Lee et al., 2016).

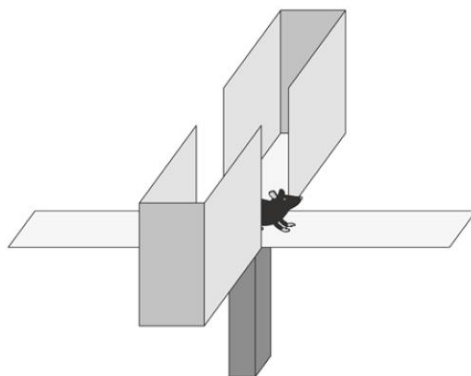


**Figura 6.** Representação do teste de campo aberto. Imagem adaptada (Muir et al., 2019).

### 3.3.3.

#### LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O teste de LCE consiste em um aparato de madeira, em forma de cruz, com quatro braços dispostos de forma perpendicular (50 cm x 10 cm), sendo dois braços abertos, dois braços fechados por paredes laterais (42 cm altura), e uma área central (10 cm x 10 cm), cruzando todos os braços (**Figura 8**). O aparato é elevado 50cm acima do chão. O animal foi colocado no centro do labirinto, de frente para um braço fechado, podendo explorar o ambiente livremente por 5 minutos. As análises do comportamento de cada animal foram feitas pelo programa X-Plo-Rat (versão 3.3.0), contabilizando os números totais de entradas nos braços abertos e fechados, tempo (s) e porcentagem total nos braços abertos. Uma entrada para qualquer braço foi apenas contabilizada quando todas as quatro patas do animal estavam presentes dentro do braço. No intervalo entre um animal e outro, foi utilizada uma solução de hidróxido de amônia (0,2%) para limpar o labirinto (Cavaliere et al., 2020; Hassan et al., 2013).



**Figura 8.** Representação do teste de labirinto em cruz elevado. Imagem adaptada (Muir et al., 2019).

## 4

### ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada através do programa GraphPad Prism versão 8.0.1 (EUA). Análises de variância (ANOVA) com três vias de medidas repetidas foram feitas para avaliar a porcentagem de congelamento no teste de condicionamento de medo contextual, sendo linhagem (CAC, CTR e CBC), tratamento (losartana e salina ou valsartana e veículo) e período de teste (teste e reteste) considerados como os fatores. As variáveis dos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado foram analisadas por ANOVAs de duas vias. Linhagem (CAC, CTR e CBC), tratamento (losartana e salina ou valsartana e veículo) foram considerados como os fatores. Caso significância tenha sido atingida para algum dos fatores, ANOVAs de menor ordem foram realizadas. Para as comparações múltiplas foram realizadas análises *pos hoc* pelo método de Tukey. Os resultados obtidos estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

## 5

### RESULTADOS

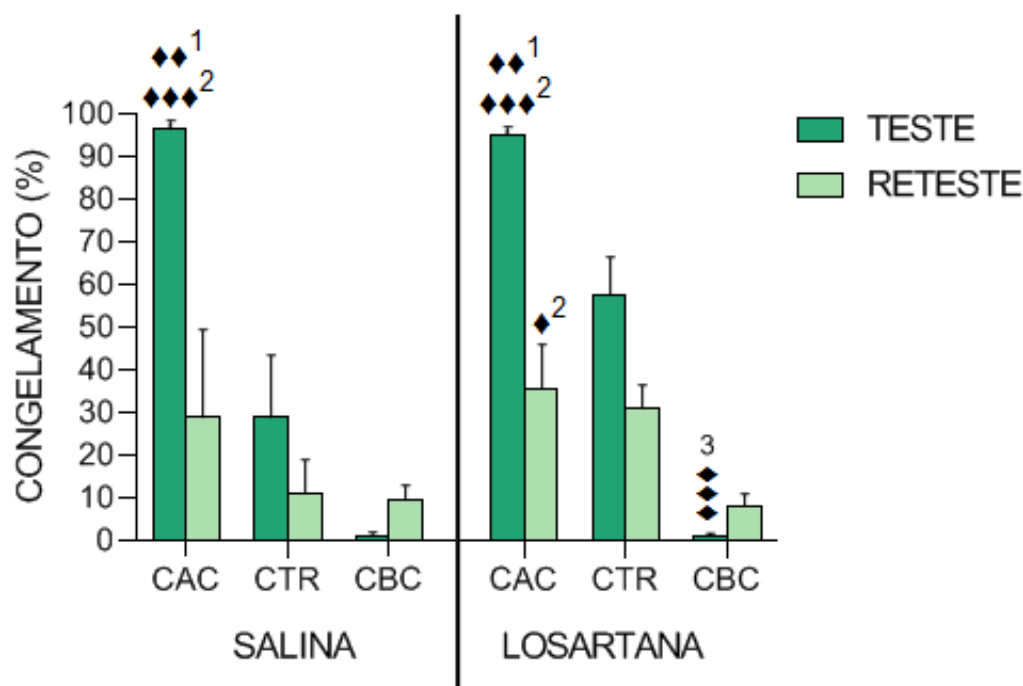
#### 5.1.

#### EXPERIMENTO 1 – TRATAMENTO CRÔNICO COM LOSARTANA

##### 5.1.1.

##### CONDICIONAMENTO DE MEDO CONTEXTUAL

A **Figura 9** representa, em porcentagem, o tempo de congelamento no teste e reteste dos animais submetidos ao tratamento crônico com losartana ou veículo, das linhagens CAC, CTR e CBC no teste de condicionamento de medo contextual. A ANOVA de três vias de medidas repetidas revelou que a linhagem, o período de teste e a interação entre linhagem x período de teste produziram efeitos estatisticamente significativos quanto à medida do tempo de congelamento [ $F_{(2,48)} = 51,68$ ;  $F_{(1,48)} = 30,11$  e  $F_{(2,48)} = 18,99$  respectivamente;  $p < 0,0001$  em ambos os casos]. Não foram observados efeitos significativos no tratamento [ $F_{(1,48)} = 3,424$ ;  $p = 0,07$ ], nas interações entre linhagem x tratamento [ $F_{(2,48)} = 2,778$ ;  $p = 0,07$ ] e tratamento x período de teste [ $F_{(1,48)} = 0,007562$ ;  $p = 0,93$ ], nem na interação de três vias linhagem x tratamento x período de teste [ $F_{(2,48)} = 0,2619$ ;  $p = 0,77$ ].

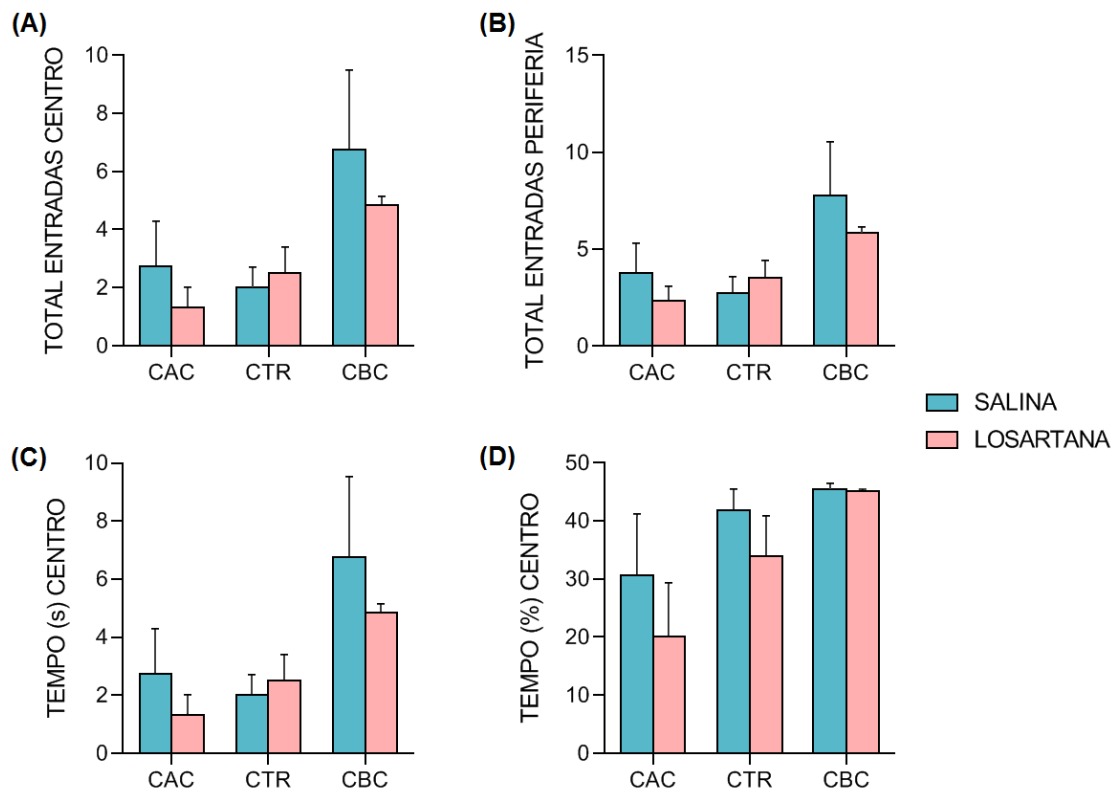


**Figura 9. Condicionamento de Medo Contextual – Tratamento Crônico:** Média  $\pm$  EPM do tempo de congelamento (%) no teste de condicionamento de medo contextual no teste e reteste dos animais submetidos ao tratamento crônico, via minibomba osmótica, de losartana ( $n = 6$ ) ou salina ( $n = 4$ ). ♦  $p < 0,05$ , ♦♦  $p < 0,001$  e ♦♦♦  $p < 0,0001$ : sinalizam comparação entre as linhagens (CAC x CTR: 1; CAC x CBC: 2; CBC x CTR: 3).

### 5.1.2.

#### CAMPO ABERTO

A **Figura 10** ilustra o número total de entradas no centro (Fig. 10A), número total de entradas na periferia (Fig. 10B) e o tempo (em s e %, Figs. 10C e 10D, respectivamente) na área central do teste de campo aberto, nos animais submetidos ao tratamento crônico com losartana ou salina. Foi observado um efeito significativo da linhagem no número total de entradas na área central entre as linhagens [ $F_{(2,24)} = 6,122$ ;  $p < 0,01$ ], mas não foi observado efeito do tratamento [ $F_{(1,24)} = 0,9220$ ;  $p = 0,35$ ] nem uma interação entre linhagem x tratamento [ $F_{(2,24)} = 0,5607$ ;  $p = 0,56$ ] (**Figura 10A**).



**Figura 10. Campo Aberto – Tratamento Crônico:** Média  $\pm$  EPM do número total de entradas no centro **(A)**, número total de entradas na periferia **(B)**, do tempo em segundos **(C)** e do percentual de tempo **(D)** na área central do teste de campo aberto, nos animais submetidos ao tratamento crônico, via minibomba osmótica, de losartana ( $n = 6$ ) ou salina ( $n = 4$ ).

O número total de entradas na periferia demonstrou diferença significativa entre as linhagens [ $F_{(2,24)} = 6,218$ ;  $p < 0,01$ ], mas não foi observada nenhuma significância no fator tratamento [ $F_{(1,24)} = 0,7541$ ;  $p = 0,39$ ] e na interação linhagem x tratamento [ $F_{(2,24)} = 0,6811$ ;  $p = 0,51$ ] (**Figura 10B**).

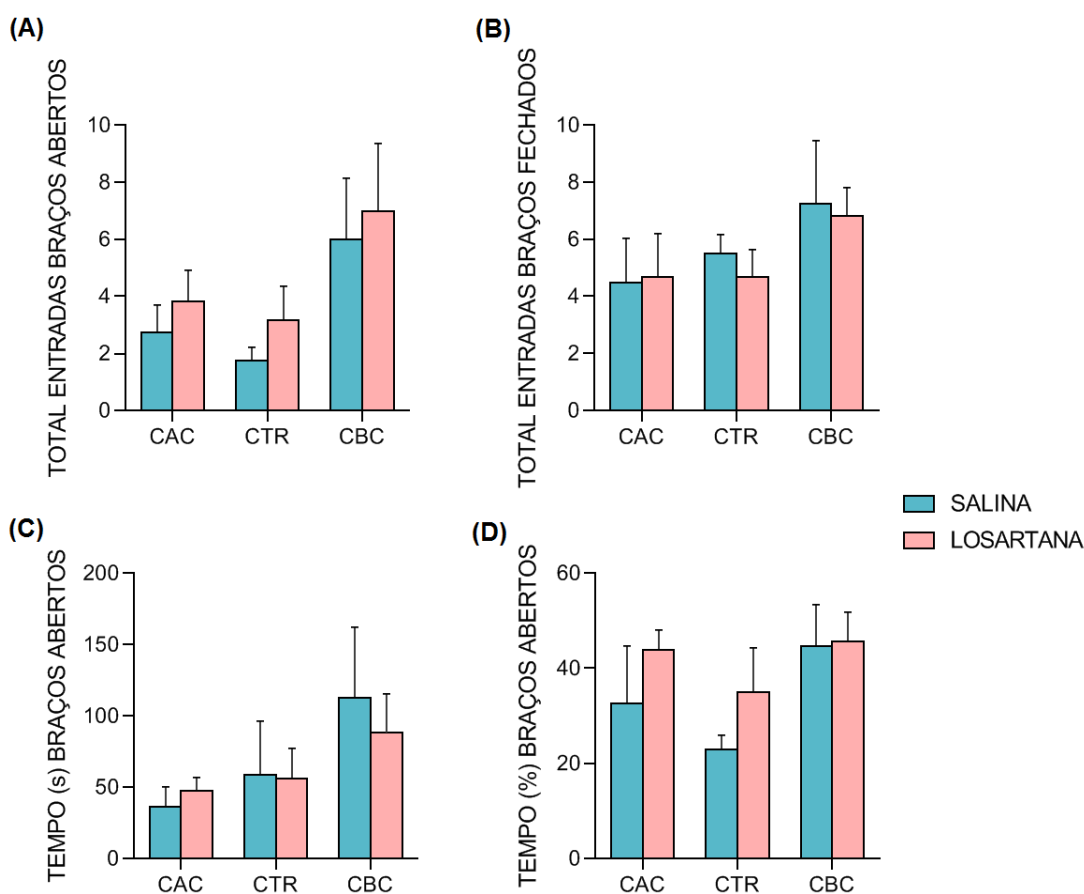
As ANOVAs de duas vias para o tempo (**Figura 10C**) e para o percentual de tempo (**Figura 10D**) gasto na área central do campo aberto indicaram um efeito significativo da linhagem (percentual de tempo: [ $F_{(2,24)} = 4,251$ ;  $p < 0,05$ ], tempo: [ $F_{(2,24)} = 6,122$ ;  $p < 0,01$ ]). Contudo, para ambas as medidas, não foram observadas significâncias estatísticas quanto ao fator tratamento (percentual de tempo: [ $F_{(1,24)} = 1,229$ ;  $p = 0,28$ ], tempo: [ $F_{(1,24)} = 0,9220$ ;  $p = 0,34$ ]) e a interação entre linhagem x tratamento (percentual de tempo: [ $F_{(2,24)} = 0,3067$ ;  $p = 0,74$ ], tempo: [ $F_{(2,24)} = 0,5607$ ;  $p = 0,58$ ]).

### 5.1.3.

#### LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

A **Figura 11** mostra o número de entradas nos braços abertos (Fig. 11A), número total de entradas nos braços fechados (Fig. 11B) e o tempo (em s e %, Figs. 11C e 11D, respectivamente) nos braços abertos do teste de labirinto em cruz elevado, nos animais submetidos ao tratamento crônico com losartana ou salina. Para todas as variáveis não foi identificado nenhum efeito significativo.

Não houve significância no número total de entradas nos braços abertos quanto ao fator linhagem [ $F_{(1,16)} = 0,5850$ ;  $p = 0,45$ ], tratamento [ $F_{(1,16)} = 1,316$ ;  $p = 0,26$ ] e na interação entre linhagem x tratamento [ $F_{(1,16)} = 0,02340$ ;  $p = 0,88$ ] (**Figura 11A**). Da mesma maneira, o número total de entradas nos braços fechados não demonstrou diferença significativa entre as linhagens [ $F_{(2,24)} = 1,750$ ;  $p = 0,19$ ], no fator tratamento [ $F_{(1,24)} = 0,1014$ ;  $p = 0,75$ ] e na interação linhagem x tratamento [ $F_{(2,24)} = 0,06539$ ;  $p = 0,93$ ] (**Figura 11B**).



**Figura 11. Labirinto em Cruz Elevado – Tratamento Crônico:** Média  $\pm$  EPM do número total de entradas nos braços abertos (A), número total de entradas nos braços fechados (B), do tempo em

segundos **(C)** e do percentual de tempo **(D)** nos braços abertos do teste de labirinto em cruz elevado, nos animais submetidos ao tratamento crônico, via minibomba osmótica, com losartana (n = 6) ou salina (n = 4).

As ANOVAs de duas vias para o tempo em segundos (**Figura 11C**) e para o percentual de tempo (**Figura 11D**) gasto nos braços abertos do labirinto não indicaram efeito significativo nas linhagens (percentual de tempo: [ $F_{(2,24)} = 2,211$ ;  $p = 0,13$ ] e tempo: [ $F_{(2,24)} = 2,486$ ;  $p = 0,10$ ]). Além disso, tanto para o percentual de tempo quanto para o tempo gasto em segundos, não foram observadas significâncias estatísticas no fator tratamento (percentual de tempo: [ $F_{(1,24)} = 1,657$ ;  $p = 0,21$ ] e tempo: [ $F_{(1,24)} = 0,06414$ ;  $p = 0,80$ ]) e a interação entre linhagem x tratamento (percentual de tempo: [ $F_{(2,24)} = 0,3073$ ;  $p = 0,73$ ] e tempo: [ $F_{(2,24)} = 0,2139$ ;  $p = 0,80$ ]).

## 5.2.

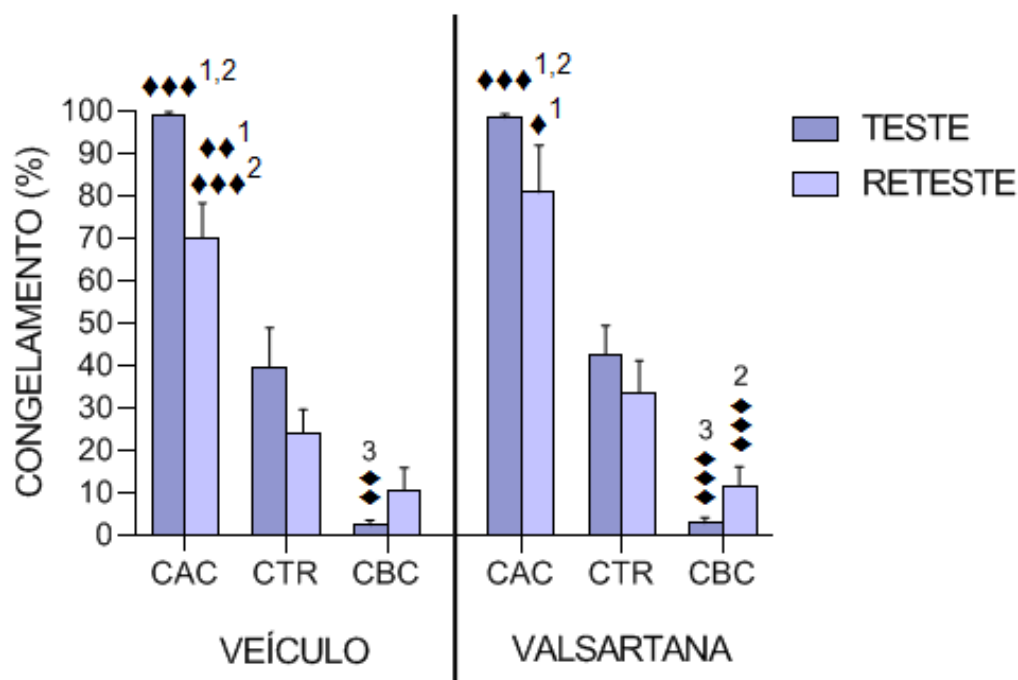
### EXPERIMENTO 2 – TRATAMENTO AGUDO COM VALSARTANA

#### 5.2.1.

#### CONDICIONAMENTO DE MEDO CONTEXTUAL

A **Figura 12** demonstra a resposta de congelamento, em porcentagem, no teste e reteste dos animais submetidos ao tratamento agudo, via gavagem, com valsartana ou veículo. Semelhante ao observado para o tratamento crônico com losartana, a análise por ANOVA de três vias de medidas repetidas identificou apenas efeitos significativos da linhagem [ $F_{(2,72)} = 149,8$ ;  $p < 0,0001$ ], período de teste [ $F_{(1,72)} = 5,537$ ;  $p < 0,05$ ] e uma interação entre linhagem x período de teste [ $F_{(2,72)} = 5,667$ ;  $p < 0,01$ ].





**Figura 12. Condicionamento de Medo Contextual – Tratamento Agudo:** Média  $\pm$  EPM do tempo de congelamento (%) no teste de condicionamento de medo contextual no teste e reteste dos animais submetidos ao tratamento agudo, via gavagem, com valsartana (CAC: n = 8; CTR: n = 8; CBC: n = 6) ou veículo (CAC: n = 7; CTR: n = 7; CBC: n = 6). ♦ p < 0,01, ♦♦ p < 0,001 e ♦♦♦ p < 0,0001: sinalizam comparação entre as linhagens (CAC x CTR: 1; CAC x CBC: 2; CBC x CTR: 3).

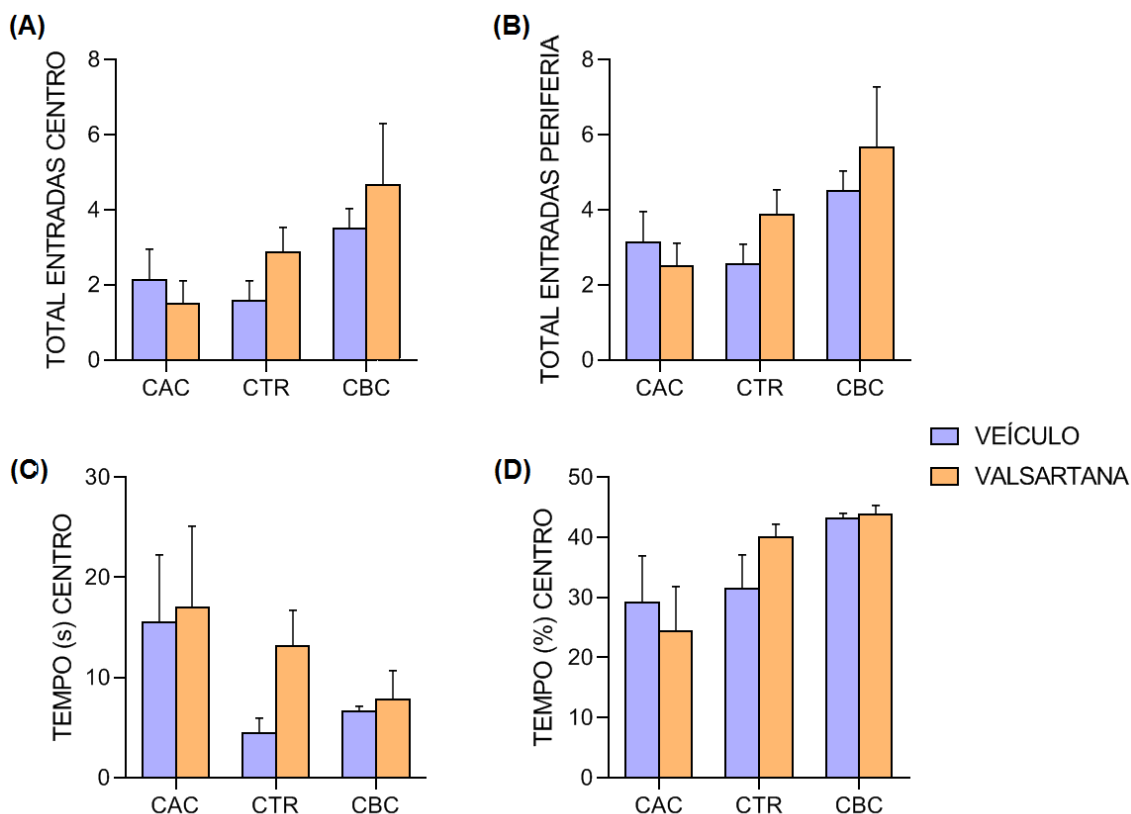
Não houve efeito do tratamento [ $F_{(1,72)} = 1,091$ ; p = 0,29], nem significância estatística das interações entre linhagem x tratamento [ $F_{(2,72)} = 0,1717$ ; p = 0,84] e tratamento x período de teste [ $F_{(1,72)} = 0,6282$ ; p = 0,43]. A interação tripla entre linhagem x tratamento x tempo, também não foi significativa [ $F_{(2,72)} = 0,1639$ ; p = 0,85].

### 5.2.2.

#### CAMPO ABERTO

A **Figura 13** ilustra o número total de entradas no centro (Fig. 13A), número total de entradas na periferia (Fig.13B) e o tempo (em s e %, Figs. 13C e 13D, respectivamente) na área central do teste de campo aberto, nos animais submetidos ao tratamento agudo com valsartana ou veículo. Tanto para o número total de entradas na área central quanto para o número de entradas na periferia não foram observadas significâncias estatísticas para, com ambas

apresentando valores iguais para o fator tratamento [ $F_{(1,36)} = 0,8029$ ;  $p = 0,37$ ], tão pouco na interação entre linhagem x tratamento [ $F_{(2,36)} = 0,8953$ ;  $p = 0,41$ ]. No entanto, no fator linhagem houve uma diferença significativa [ $F_{(2,36)} = 3,925$ ;  $p = 0,02$ ], porém essa diferença demonstra apenas o efeito padrão e esperado das respectivas linhagens (**Figuras 13A e 13B**).



**Figura 13. Campo Aberto – Tratamento Agudo:** Média  $\pm$  EPM do número total de entradas no centro **(A)**, número total de entradas na periferia **(B)**, do tempo em segundos **(C)** e do percentual de tempo **(D)** na área central do teste de campo aberto, nos animais submetidos ao tratamento agudo, via gavagem, com valsartana (CAC:  $n = 8$ ; CTR:  $n = 8$ ; CBC:  $n = 6$ ) ou veículo (CAC:  $n = 7$ ; CTR:  $n = 7$ ; CBC:  $n = 6$ ).

A ANOVA de duas vias revelou diferença no tempo (s) gasto (**Figura 13C**) no centro do campo aberto na linhagem [ $F_{(2,36)} = 4,794$ ;  $p < 0,05$ ]. Não houve alteração no efeito do tratamento [ $F_{(1,36)} = 0,1106$ ;  $p = 0,74$ ] e nem na interação entre linhagem x tratamento: [ $F_{(2,36)} = 0,8373$ ;  $p = 0,44$ ].

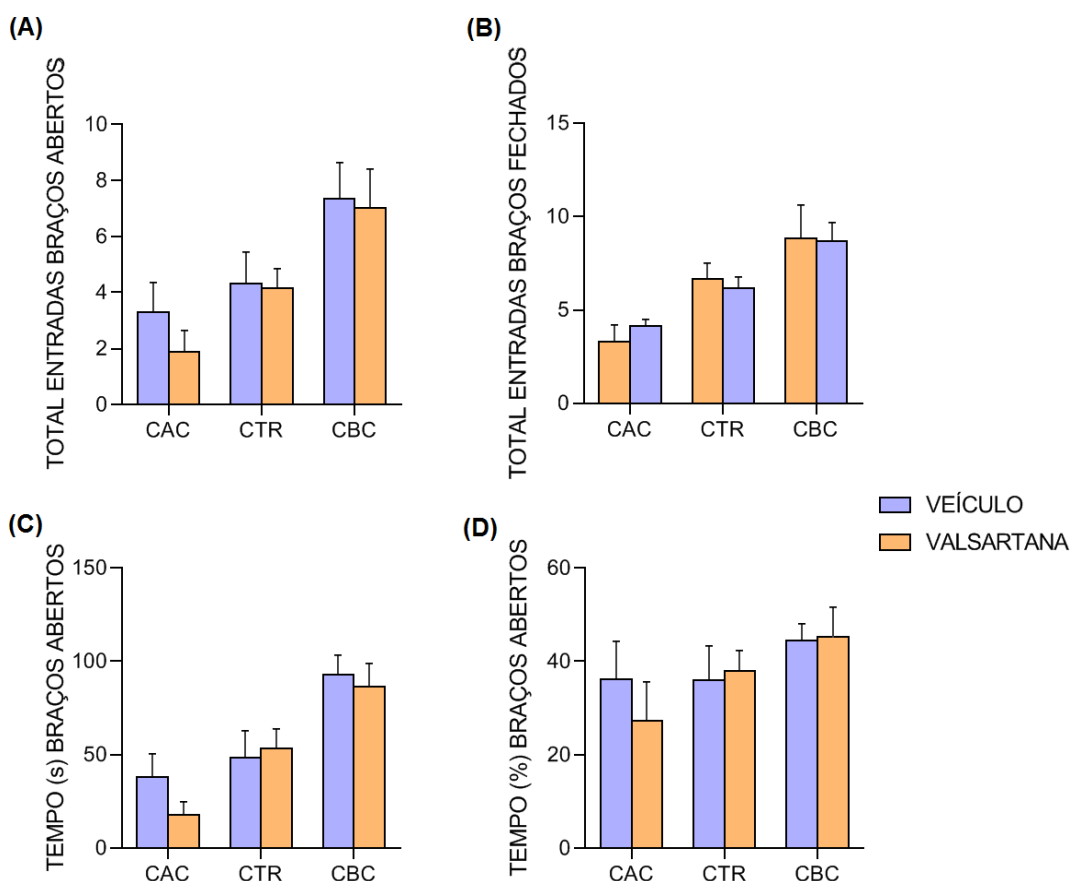
O total de tempo (%) gasto (**Figura 13D**), analisado por ANOVA de duas não demonstrou significância na linhagem [ $F_{(2,36)} = 1,819$ ;  $p = 0,17$ ], tratamento

$[F_{(1,36)} = 0,8088; p = 0,37]$  e na interação entre linhagem x tratamento  $[F_{(2,36)} = 0,3613; p = 0,69]$ .

### 5.3.2.

#### LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

A **Figura 14** representa o número de entradas nos braços abertos (Fig. 14A), número total de entradas nos braços fechados (Fig. 14B) e o tempo (em s e %, Figs. 14C e 14D, respectivamente) nos braços abertos do teste de labirinto em cruz elevado, nos animais submetidos ao tratamento agudo, via gavagem, com valsartana ou veículo. O número de entradas nos braços abertos mostrou uma diferença significativa no fator linhagem  $[F_{(2,35)} = 9,558; p < 0,001]$ . Mas não houve significância no tratamento  $[F_{(1,35)} = 0,5745; p = 0,45]$  e na interação linhagem x tratamento  $[F_{(2,35)} = 0,2285; p = 0,79]$  (**Figura 14A**).



**Figura 14. Labirinto em Cruz Elevado – Tratamento Agudo:** Média ± EPM do número total de entradas nos braços abertos (A), número total de entradas nos braços fechados (B), do tempo em segundos (C) e do percentual de tempo (D) nos braços abertos do teste de labirinto em cruz

elevado, nos submetidos ao tratamento agudo, via gavagem, com valsartana (CAC: n = 8; CTR: n = 8; CBC: n = 6) ou veículo (CAC: n = 7; CTR: n = 7; CBC: n = 6).

Da mesma forma, o número total de entradas nos braços fechados demonstrou um efeito significativo nas linhagens [ $F_{(2,35)} = 13,80$ ;  $p < 0,0001$ ], mas não houve diferença significativa no fator tratamento [ $F_{(1,35)} = 0,008188$ ;  $p = 0,92$ ] e na interação linhagem x tratamento [ $F_{(2,35)} = 0,2907$ ;  $p = 0,74$ ] (**Figura 14B**).

O total de tempo (s) (**Figura 14C**) nos braços abertos não constatou diferença na linhagem [ $F_{(2,35)} = 1,858$ ;  $p = 0,17$ ], tratamento [ $F_{(1,35)} = 0,1413$ ;  $p = 0,7$ ] e interação linhagem x tratamento [ $F_{(2,35)} = 0,4150$ ;  $p = 0,66$ ].

O tempo (%) nos braços abertos (**Figura 14D**) revelou diferença significativa no fator linhagem [ $F_{(2,35)} = 14,30$ ;  $p < 0,0001$ ], mas nos fatores tratamento [ $F_{(1,35)} = 0,5958$ ;  $p = 0,44$ ] e na interação linhagem x tratamento [ $F_{(2,35)} = 0,6631$ ;  $p = 0,52$ ] não houve significância.

## 6

**DISCUSSÃO**

Nos casos de transtornos de ansiedade, a hiperativação do SRA estimula a hiperativação do eixo HPA, causando um efeito ansiogênico cíclico nas respostas neuroendócrinas e, conseqüentemente, nos comportamentos fisiológicos relacionados à ansiedade (Bali & Jaggi, 2013; Gironacci et al., 2018). O uso de anti-hipertensivos para além de condições clínicas de hipertensão e cardiovasculares vêm sendo cada vez mais aplicado. Estudos já relataram os possíveis efeitos benéficos do tratamento com um anti-hipertensivo em casos de transtorno do estresse pós-traumático (Khoury et al., 2012), diabetes mellitus (Pavlatou et al., 2008) e em casos de ansiedade (Reinecke et al., 2018; J.M. Saavedra, 2017; Shad, 2020; Villapol & Saavedra, 2014).

Por conta da ação principal de um anti-hipertensivo ser a diminuição da pressão arterial, efeitos de hipotensão e letargia poderiam ser manifestados. Porém, mesmo não havendo a possibilidade de medir a pressão arterial sistólica desses animais, podemos assegurar que esses efeitos não foram observados em nenhum animal, seja no tratamento com losartana, como no valsartana. Além disso, certificamos de que o funcionamento das minibombas osmóticas, usadas para o tratamento com losartana ou salina, teve êxito. No dia de coleta de material biológico, as minibombas de todos os animais foram retiradas e o volume contido em cada uma foi averiguado. A capacidade de volume permitida pelo modelo utilizado (Alzet, 2ML4) é de 2 ml, sendo este o mesmo volume usado no preenchimento com losartana ou salina, no início dos tratamentos. Ao serem retiradas, foi notada uma diminuição no volume final de todas as minibombas, com ~ 600µl, tanto nas usadas para o anti-hipertensivo, como para salina.

O teste de condicionamento contextual avalia a resposta defensiva de congelamento dos animais, diante de estímulos aversivos, como o choque nas patas (Landeira-Fernandez et al., 2006). No presente estudo, foi avaliada duas vezes, num intervalo de 3 meses, a resposta de congelamento nos animais. O objetivo foi verificar se os tratamentos com losartana e/ou valsartana atingiriam eficácia em alterar essas respostas, mesmo sendo meses depois. Esse intervalo de tempo se baseou na constatação de que os animais possuem uma memória de medo, apresentando as mesmas expressões de congelamento meses depois (Fanselow & Gale, 2003; Gale et al., 2004).

Os resultados dos animais submetidos ao tratamento crônico com losartana corroboram os dados observados por Marvar (2014) (Marvar et al., 2014b). Nesse estudo, camundongos foram submetidos ao tratamento crônico de losartana, via minibomba osmótica, na mesma dose que usamos (10 mg/kg/dia), mas somente por um período de 14 dias. Da mesma forma, os animais tratados não apresentaram diferença na resposta de congelamento, em comparação com o grupo veículo.

Em um outro estudo foi avaliado o comportamento de defesa gerado pelo teste de esquiva em ratos Wistar tratados de forma aguda, via gavagem, com a valsartana (Braszko, 2005). Os resultados obtidos assemelham-se com os nossos, não sendo encontrada diferença significativa no condicionamento das respostas defensivas nos animais submetidos ao tratamento. Vale ressaltar que no estudo citado os animais receberam uma dose quatro vezes menor (10 mg/kg) que a do nosso estudo (40 mg/kg). Não obstante, pressupõe-se que a ação do valsartana é ineficaz para alterar o comportamento condicionado, independente das respectivas dosagens administradas.

As doses administradas tanto para o tratamento crônico com losartana quanto para o tratamento agudo com valsartana não foram eficazes em alterar as respostas de congelamento nas respectivas linhagens. As respostas observadas nos animais tratados com os anti-hipertensivos assemelham-se com as respostas dos animais tratados com a salina ou veículo. Essas respostas demonstram apenas o efeito padrão das linhagens, com os animais CAC apresentando um maior congelamento em comparação com os animais CTR e CBC (Léon et al., 2013; Salviano et al., 2014).

O teste de campo aberto permite avaliar a exploração e atividade locomotora do animal, diante de um ambiente desconhecido considerado aversivo (Gould et al., 2009). Os animais com maior perfil comportamental ansioso, assim como animais sujeitos a drogas ansiogênicas, tendem a passar a maior parte do tempo na parte periférica do campo, em proximidade com as paredes (Prut & Belzung, 2003). Em contrapartida, efeitos opostos são observados em animais submetidos à tratamentos com ações ansiolíticas, promovendo maior atividade locomotora e maior tempo gasto na área central (Prut & Belzung, 2003). Os nossos resultados mostraram que o tratamento não induziu respostas ansiolíticas nos animais CAC nas entradas e no tempo permanecido na área central. Esses resultados corroboram os apresentados em

ratos Wistar (via gavagem: 30 mg/kg/10 dias) (Costa-Ferreira et al., 2019) e em camundongos (via minibomba osmótica: 10 mg/kg/14 dias) (Marvar et al., 2014a, 2014b), observando que o tratamento, mesmo por vias de administração e doses diferentes, não alterou a exploração dos animais no campo aberto. Assim como o tratamento com losartana, o valsartana falhou em demonstrar eficácia na atividade locomotora.

Além do teste de campo aberto, o labirinto em cruz (LCE) elevado é usado para avaliar respostas associadas ao comportamento ansioso. Animais que apresentam maior número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos revelam menor associação aos comportamentos ansiosos, sendo retratado o efeito contrário para os animais que apresentam menor número de entradas e tempo nos braços abertos (Walf & Frye, 2007). O LCE verifica a resposta incondicionada ao medo em relação à altura e os espaços abertos do aparato, que pode ser modificada de acordo com o uso de alguma droga ansiogênica ou ansiolítica (Walf & Frye, 2007). Semelhante ao observado no teste de campo aberto, os tratamentos com losartana e valsartana não tiveram efeito no comportamento dos ratos Cariocas no LCE. Especificamente, o tratamento anti-hipertensivo não mostrou sucesso em promover respostas ansiolítica nos animais CAC. Nossos resultados vão de encontro aos obtidos em estudo feito com ratos Wistar tratados por 14 dias, via minibomba osmótica (Braszko, 2005), sem apresentar respostas ansiolíticas nos animais tratados, em relação aos animais controle. Em compensação, um estudo com ratos Wistar Hannover submetidos ao tratamento com o anti-hipertensivo candesartana (via minibomba osmótica: 0,5 mg/kg/14 dias) (Juan M. Saavedra et al., 2006) resultou em aumento no número de entradas e na porcentagem de tempo nos braços abertos, indicando uma notória resposta ansiolítica. Além disso, foi constatada uma diminuição na expressão dos receptores AT1 no PVN, sendo esses mesmos resultados observados com o mesmo anti-hipertensivo, (candesartana via minibomba osmótica: 1,0 mg/kg/14 dias), em outro estudo (Armando et al., 2001). Esses efeitos definem uma clara regulação na hiperativação do SRA e do eixo HPA, resultando na diminuição no padrão dos comportamentos da ansiedade, promovida pela ação do uso crônico por um anti-hipertensivo.

Estudos prévios realizados nos animais Cariocas demonstraram um aumento na ativação neuronal no PVN, indicando uma hiperativação do eixo HPA, nos animais CAC, em comparação com os animais CTR e CBC. Essa resposta neuronal foi observada pela proteína *c-Fos*, sendo esta uma medida

indireta de atividade neuronal, que apresentou uma maior expressão nos animais mais ansiosos, os CAC (León et al., 2020). Além disto, a teoria da hiperativação do eixo HPA e a relação do PVN, nos animais CAC, também é embasada por estudos prévios que observaram um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona nesses animais (Léon et al., 2013; Mousovich-Neto et al., 2015).

Por conta da hiperativação do eixo HPA já observada nos animais CAC, pressupomos que o tratamento com os anti-hipertensivos da classe dos ARA poderiam agir de forma central, regulando tanto a ação do eixo HPA quanto a ação do SRA. Nossos resultados demonstraram uma ineficácia da losartana e da valsartana, nas doses administradas, em promover efeitos ansiolíticos nos animais, indicando que ambos medicamentos falharam em ultrapassar a BHE e agir no sistema nervoso central (SNC). Diferentes estudos argumentam sobre a probabilidade da losartana e valsartana em ultrapassarem a BHE, exercendo seus efeitos diretamente no SNC. Enquanto algumas pesquisas demonstram que tanto a losartana (Hazlewood et al., 2018; J. M. Wang et al., 2003) quanto a valsartana (Jackson et al., 2018) podem ultrapassar a BHE, outras pesquisas contestam essas informações, relatando que ambas ultrapassam em mínimas quantidades ou não são capazes de ultrapassar (Michel et al., 2013). Dessa forma, futuros estudos devem ser feitos, com a administração de diferentes doses, para analisar a probabilidade dos respectivos fármacos em ultrapassar a BHE.

O presente estudo é o primeiro relato com o uso de fármacos anti-hipertensivos da classe dos ARAs nas linhagens fenotipadas, CAC e CBC. Em nossos resultados, apesar de não verificarmos parâmetros hormonais e neuroquímicos a respeito da relação do SRA com o eixo HPA, foi observado que nos padrões comportamentais relacionados à ansiedade não houve nenhum efeito significativo, levantando a hipótese de que os anti-hipertensivos não foram capazes de regular tanto o SRA como o eixo HPA. Em contrapartida, existe uma ampla literatura destacando os diversos efeitos benéficos e ansiolíticos pelo uso de anti-hipertensivos. Além dos ARAs, a classe dos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (iECA) também é comumente usada, agindo de forma competitiva e inibindo a conversão da ANG I para a ANG II (Goyal et al., 2020; Khalil & Zeltser, 2020). O captopril é um dos exemplos dos iECA, passando livremente pela barreira hematoencefálica e agindo de forma central



(Sharma, 1987), apresentando efeitos similares aos do antagonista do receptor AT1 (Vian et al., 2017).

À vista disso, compreendendo que a linhagem CAC é reconhecida como um importante modelo animal para a avaliação de transtornos de ansiedade, propõe-se que futuros trabalhos, dentro do relatado, considerem novas possibilidades e oportunidades na investigação dos efeitos dos anti-hipertensivos. Avaliando as diferentes vias de administração e dosagens, assim como as respostas do congelamento em um menor intervalo de tempo no reteste no teste de condicionamento de medo contextual, utilizando diferentes classes de anti-hipertensivos, como os iECA. Explorando seus efeitos para além dos observados nos testes comportamentais, como nos mecanismos neuroendócrinos e biológicos relacionados à associação do SRA com o eixo HPA.

## 7

### CONCLUSÃO

Em síntese, nossos resultados demonstram que a administração, tanto crônica como aguda, de medicamentos anti-hipertensivos da classe dos ARA, não são capazes de modular a ansiedade nas linhagens CAC.

## 8

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, G. (2011). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by neuropeptides. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 7(2), 327–336. <https://doi.org/10.1515/HMBCI.2011.123>
- Aguilera, G., Kiss, A., Luo, X., & Akbasak, B.-S. (1995). The Renin Angiotensin System and the Stress Response. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 771, 173–186. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb44679.x>
- Allen, A. M., Oldfield, B. J., Giles, M. E., Paxinos, G., McKinley, M. J., & Mendelsohn, F. A. O. (2000). Localization of angiotensin receptors in the nervous system. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy: Peptide Receptors Part 1* (Vol. 16, pp. 79–124). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0924-8196\(00\)80005-6](https://doi.org/10.1016/S0924-8196(00)80005-6)
- American Psychiatric Association. (2014). *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais: DSM-5* (5th ed.). Artmed.
- Armando, I., Carranza, A., Nishimura, Y., Hoe, K.-L., Barontini, M., Terrón, J. A., Falcón-Neri, A., Ito, T., Juorio, A. V., & Saavedra, J. M. (2001). Peripheral Administration of an Angiotensin II AT1 Receptor Antagonist Decreases the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Isolation Stress. *Endocrinology*, 142(9), 3880–3889. <https://doi.org/10.1210/endo.142.9.8366>
- Armando, I., Volpi, S., Aguilera, G., & Saavedra, J. M. (2007). Angiotensin II AT1 receptor blockade prevents the hypothalamic corticotropin-releasing factor response to isolation stress. *Brain Research*, 1142, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.037>
- Bader, M. (2010). Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems: Targets for Pharmacological Therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50(1), 439–465. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105610>
- Baghai, T. C., Schule, C., Zwanzger, P., Minov, C., Zill, P., Ella, R., Eser, D., Oezer, S., Bondy, B., & Rupprecht, R. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis dysregulation in patients with major depression is influenced by the insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene. *Neuroscience Letters*, 328, 299–303.

www.elsevier.com/locate/neulet

- Bali, A., & Jaggi, A. S. (2013). Angiotensin as stress mediator: Role of its receptor and interrelationships among other stress mediators and receptors. *Pharmacological Research*, 76, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.07.004>
- Bhargava, A., Wang, J., & Pearce, D. (2004). Regulation of epithelial ion transport by aldosterone through changes in gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 217(1-2), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.020>
- Blanchard, D. (2001). Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 205–218. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00009-4](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00009-4)
- Boulton, A. A., Baker, G. B., & Martin-Iverson, M. T. (1991). Animal Models in Psychiatry, I. In *Neuromethods, Volume 18* (Vol. 18). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0896031985>
- Brandão, M. L., Zanoveli, J. M., Ruiz-Martinez, R. C., Oliveira, L. C., & Landeira-Fernandez, J. (2008). Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 188, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.10.018>
- Braszko, J. (2005). Valsartan Abolishes Most of the Memory-Improving Effects of Intracerebroventricular Angiotensin II in Rats. *Clinical and Experimental Hypertension*, 8, 635–649. <https://doi.org/10.1080/10641960500298723>
- Campos, L. A., Bader, M., & Baltatu, O. C. (2017). Angiotensin—Encyclopedia of Stress. In *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology* (pp. 237–241). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802175-0.00023-1>
- Cavaliere, D. R., Maisonnète, S., Krahe, T. E., Landeira-Fernandez, J., & Cruz, A. P. M. (2020). High- and Low-conditioned Behavioral effects of midazolam in Carioca high- and low-conditioned freezing rats in an ethologically based test. *Neuroscience Letters*, 715, 134632. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134632>
- Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the Stress Response. *Annual Review of Physiology*, 67(1), 259–284.

<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816>

- Clément, Y., Calatayud, F., & Belzung, C. (2002). Genetic basis of anxiety-like behaviour: a critical review. *Brain Research Bulletin*, 57(1), 57–71. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00637-2](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00637-2)
- Costa-Ferreira, W., Morais-Silva, G., Gomes-de-Souza, L., Marin, M. T., & Crestani, C. C. (2019). The AT1 Receptor Antagonist Losartan Does Not Affect Depressive-Like State and Memory Impairment Evoked by Chronic Stressors in Rats. *Frontiers in Pharmacology*, 10(705). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00705>
- Council, N. R. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (8th ed.). The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12910>
- Culman, J., Blume, A., Gohlke, P., & Unger, T. (2002). The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT1-receptor blockers. *Journal of Human Hypertension*, 16(S3), S64–S70. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001442>
- Dias, G. P., Bevilaqua, M. C. do N., da Luz, A. C. D. S., Fleming, R. L., de Carvalho, L. A., Cocks, G., Beckman, D., Hosken, L. C., de Sant’Anna Machado, W., Corrêa-e-Castro, A. C., Mousovich-Neto, F., de Castro Gomes, V., Bastos, G. de N. T., Kubrusly, R. C. C., da Costa, V. M. C., Srivastava, D., Landeira-Fernandez, J., Nardi, A. E., Thuret, S., & Gardino, P. F. (2014). Hippocampal biomarkers of fear memory in an animal model of generalized anxiety disorder. *Behavioural Brain Research*, 263, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.012>
- Downie, L. E., Pianta, M. J., Vingrys, A. J., Wilkinson-Berka, J. L., & Fletcher, E. L. (2008). AT1 receptor inhibition prevents astrocyte degeneration and restores vascular growth in oxygen-induced retinopathy. *Glia*, 56(10), 1076–1090. <https://doi.org/10.1002/glia.20680>
- Fanselow, M. S., & Gale, G. D. (2003). The Amygdala, Fear, and Memory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 985, 125–134. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07077.x>
- Farag, E., Sessler, D. I., Ebrahim, Z., Kurz, A., Morgan, J., Ahuja, S., Maheshwari, K., & John Doyle, D. (2017). The renin angiotensin system and the brain: New developments. *Journal of Clinical Neuroscience*, 46, 1–8.

<https://doi.org/10.1016/j.jocn.2017.08.055>

- Faravelli, C., Lo Sauro, C., Lelli, L., Pietrini, F., Lazzeretti, L., Godini, L., Benni, L., Fioravanti, G., Alina Talamba, G., Castellini, G., & Ricca, V. (2012). The Role of Life Events and HPA Axis in Anxiety Disorders: A Review. *Current Pharmaceutical Design*, 18(35), 5663–5674. <https://doi.org/10.2174/138161212803530907>
- Fink, G. (2017). *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology* (1st ed., Vol. 2). Academic Press.
- Fisch, G. S., & Flint, J. (Eds.). (2006). *Transgenic and Knockout Models of Neuropsychiatric Disorders*. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-058-4>
- Forrester, S. J., Booz, G. W., Sigmund, C. D., Coffman, T. M., Kawai, T., Rizzo, V., Scalia, R., & Eguchi, S. (2018). Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 98(3), 1627–1738. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2017>
- Gale, G. D., Anagnostaras, S. G., Godsil, B. P., Mitchell, S., Nozawa, T., Sage, J. R., Wiltgen, B., & Fanselow, M. S. (2004). Role of the Basolateral Amygdala in the Storage of Fear Memories across the Adult Lifetime of Rats. *Journal of Neuroscience*, 24(15), 3810–3815. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4100-03.2004>
- Gao, F., Yao, M., Cao, Y., Liu, S., Liu, Q., & Duan, H. (2016). Valsartan ameliorates podocyte loss in diabetic mice through the Notch pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(5), 1328–1336. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2525>
- Gard, P. R. (2002). The role of angiotensin II in cognition and behaviour. *European Journal of Pharmacology*, 438(1-2), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01283-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01283-9)
- Gebre, A. K., Altaye, B. M., Atey, T. M., Tuem, K. B., & Berhe, D. F. (2018). Targeting Renin–Angiotensin System Against Alzheimer’s Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 9(440). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00440>
- Gironacci, M. M., Vicario, A., Cerezo, G., & Silva, M. G. (2018). The depressor axis of the renin–angiotensin system and brain disorders: a translational approach. *Clinical Science*, 132(10), 1021–1038.

<https://doi.org/10.1042/CS20180189>

- Gomes, V. de C., Hassan, W., Maisonnnette, S., Johnson, L. R., Ramos, A., & Landeira-Fernandez, J. (2013). Behavioral evaluation of eight rat lines selected for high and low anxiety-related responses. *Behavioural Brain Research*, 257, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.028>
- Gomes, V. de C., & Landeira-Fernandez, J. (2008). Amygdaloid lesions produced similar contextual fear conditioning disruption in the Carioca high- and low-conditioned freezing rats. *Brain Research*, 1233, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.044>
- Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The Open Field Test. In *Neuromethods* (Vol. 42, pp. 1–20). [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1)
- Goyal, A., Cusick, A. S., & Thielemier, B. (2020). ACE Inhibitors. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430896/>
- Graeff, F. G., & Junior, H. Z. (2010). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety and panic. *Psychology & Neuroscience*, 3(1), 3–8. <https://doi.org/10.3922/j.psns.2010.1.002>
- Gross, V., Schunck, W.-H., Honeck, H., Milia, A. F., Kärge, E., Walther, T., Bader, M., Inagami, T., Schneider, W., & Luft, F. C. (2000). Inhibition of pressure natriuresis in mice lacking the AT2 receptor. *Kidney International*, 57(1), 191–202. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00820.x>
- Härter, M. C., Conway, K. P., & Merikangas, K. R. (2003). Associations between anxiety disorders and physical illness. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 253(6), 313–320. <https://doi.org/10.1007/s00406-003-0449-y>
- Hassan, W., Gomes, V. de C., Pinton, S., Rocha, J. B. T. da, & Landeira-Fernandez, J. (2013). Association between oxidative stress and contextual fear conditioning in Carioca high- and low-conditioned freezing rats. *Brain Research*, 1512, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.03.039>
- Hazlewood, R. J., Chen, Q., Clark, F. K., Kuchtey, J., & Kuchtey, R. W. (2018). Differential effects of angiotensin II type I receptor blockers on reducing intraocular pressure and TGFβ signaling in the mouse retina. *PLoS ONE*, 13(8), e0201719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201719>

- Herichova, I., & Szantoova, K. (2013). Renin-angiotensin system: Upgrade of recent knowledge and perspectives. *Endocrine Regulations*, 47, 39–52. [https://doi.org/10.4149/endo\\_2013\\_01\\_39](https://doi.org/10.4149/endo_2013_01_39)
- Jackson, L., Eldahshan, W., Fagan, S., & Ergul, A. (2018). Within the Brain: The Renin Angiotensin System. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 876. <https://doi.org/10.3390/ijms19030876>
- Jacobson, L. H., & Cryan, J. F. (2009). Genetic Approaches to Modeling Anxiety in Animals. In *Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment* (Vol. 2, pp. 161–201). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2009\\_31](https://doi.org/10.1007/7854_2009_31)
- Joëls, M., Sarabdjitsingh, R. A., & Karst, H. (2012). Unraveling the Time Domains of Corticosteroid Hormone Influences on Brain Activity: Rapid, Slow, and Chronic Modes. *Pharmacological Reviews*, 64(4), 901–938. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005892>
- Khalil, H., & Zeltser, R. (2020). Antihypertensive Medications. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554579/>
- Khoury, N. M., Marvar, P. J., Gillespie, C. F., Wingo, A., Schwartz, A., Bradley, B., Kramer, M., & Ressler, K. J. (2012). The Renin-Angiotensin Pathway in Posttraumatic Stress Disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 73(6), 849–855. <https://doi.org/10.4088/JCP.11m07316>
- Koeppen, B. M., & Stanton, B. A. (2017). *Berne & Levy Physiology* (7th ed.). Elsevier.
- Lammert, E., & Zeeb, M. (2014). *Metabolism of Human Diseases: Organ Physiology and Pathophysiology*. Springer.
- Landeira-Fernandez, J., Pedro De Mello Cruz, A., & Lira Brandão, M. (2006). Padrões de Respostas Defensivas de Congelamento Associados a Diferentes Transtornos de Ansiedade. *Psicologia USP*, 17(4), 175–192.
- Lee, B., Sur, B., Yeom, M., Shim, I., Lee, H., & Hahm, D.-H. (2016). Effects of systemic administration of ibuprofen on stress response in a rat model of post-traumatic stress disorder. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 20(4), 357–366. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2016.20.4.357>
- León, L. A., Brandão, M. L., Cardenas, F. P., Parra, D., Krahe, T. E., Cruz, A. P. M., & Landeira-Fernandez, J. (2020). Distinct patterns of brain Fos



expression in Carioca High- and Low-conditioned Freezing Rats. *PLoS ONE*, 15(7), e0236039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236039>

León, L. A., Castro-Gomes, V., Zárate-Guerrero, S., Corredor, K., Cruz, A. P. M., Brandão, M. L., Cardenas, F. P., & Landeira-Fernandez, J. (2017). Behavioral Effects of Systemic, Infralimbic and Prelimbic Injections of a Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> Antagonist in Carioca High- and Low-Conditioned Freezing Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11(117). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00117>

Léon, L. A., Gomes, V. C., Lira Brandão, M., Rodrigues, C., Cardenas, F. P., & Landeira-Fernandez, J. (2013). Corticosterone plasma concentrations in Carioca High- and Low-conditioned freezing rats after a fear conditioned task. *Avances En Psicología Latinoamericana*, 31(1), 279–287. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-47242013000100022&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-47242013000100022&lng=en&nrm=iso)

Leonard, B. E. (2005). The HPA and immune axes in stress: the involvement of the serotonergic system. *European Psychiatry*, 20(S3), S302–S306. [https://doi.org/10.1016/S0924-9338\(05\)80180-4](https://doi.org/10.1016/S0924-9338(05)80180-4)

Leonardo, E. D., & Hen, R. (2006). Genetics of Affective and Anxiety Disorders. *Annual Review of Psychology*, 57, 117–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.57.102904.190118>

Leong, D. S., Terrón, J. A., Falcón-Neri, A., Armando, I., Ito, T., Jöhren, O., Tonelli, L. H., Hoe, K.-L., & Saavedra, J. M. (2002). Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT<sub>1A</sub>, AT<sub>1B</sub> and AT<sub>2</sub> receptors. *Neuroendocrinology*, 75(4), 227–240. <https://doi.org/10.1159/000054714>

Marvar, P. J., Goodman, J., Fuchs, S., Choi, D. C., Banerjee, S., & Ressler, K. J. (2014a). Angiotensin Type 1 Receptor Inhibition Enhances the Extinction of Fear Memory - Supplemental Information. *Biological Psychiatry*, 75(11).

Marvar, P. J., Goodman, J., Fuchs, S., Choi, D. C., Banerjee, S., & Ressler, K. J. (2014b). Angiotensin Type 1 Receptor Inhibition Enhances the Extinction of Fear Memory. *Biological Psychiatry*, 75(11), 864–872. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.08.024>

McEwen, B. S. (2007). Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation:

Central Role of the Brain. *Physiological Reviews*, 87(3), 873–904.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006>

McEwen, B. S., & Gianaros, P. J. (2010). Central role of the brain in stress and adaptation: Links to socioeconomic status, health, and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1186, 190–222.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05331.x>

McKinley, M. J., Albiston, A. L., Allen, A. M., Mathai, M. L., May, C. N., McAllen, R. M., Oldfield, B. J., Mendelsohn, F. A. O., & Chai, S. Y. (2003). The brain renin–angiotensin system: location and physiological roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(6), 901–918.  
[https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00306-0)

Michel, M. C., Foster, C., Brunner, H. R., & Liu, L. (2013). A systematic comparison of the properties of clinically used angiotensin II type 1 receptor antagonists. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 65, Issue 2, pp. 809–848). American Society for Pharmacology and Experimental Therapy.  
<https://doi.org/10.1124/pr.112.007278>

Michopoulos, V., Powers, A., Gillespie, C. F., Ressler, K. J., & Jovanovic, T. (2017). Inflammation in Fear- and Anxiety-Based Disorders: PTSD, GAD, and Beyond. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 254–270.  
<https://doi.org/10.1038/npp.2016.146>

Mousovich-Neto, F., Lourenço, A. L., Landeira-Fernandez, J., & Corrêa da Costa, V. M. (2015). Endocrine and metabolic function in male Carioca High-conditioned Freezing rats. *Physiology & Behavior*, 142, 90–96.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.01.028>

Muir, J., Lopez, J., & Bagot, R. C. (2019). Wiring the depressed brain: optogenetic and chemogenetic circuit interrogation in animal models of depression. *Neuropsychopharmacology*, 44(6), 1013–1026.  
<https://doi.org/10.1038/s41386-018-0291-6>

Nakagawa, P., Gomez, J., Grobe, J. L., & Sigmund, C. D. (2020). The Renin-Angiotensin System in the Central Nervous System and Its Role in Blood Pressure Regulation. *Current Hypertension Reports*, 22(1), 7.  
<https://doi.org/10.1007/s11906-019-1011-2>

Nakamura, K., Shimizu, T., Yanagita, T., Nemoto, T., Taniuchi, K., Shimizu, S.,

- Dimitriadis, F., Yawata, T., Higashi, Y., Ueba, T., & Saito, M. (2014). Angiotensin II acting on brain AT1 receptors induces adrenaline secretion and pressor responses in the rat. *Scientific Reports*, 4, 7248. <https://doi.org/10.1038/srep07248>
- Nehme, A., Zouein, F. A., Zayeri, Z. D., & Zibara, K. (2019). An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 6(2), 14. <https://doi.org/10.3390/jcdd6020014>
- Patel, S., Rauf, A., Khan, H., & Abu-Izneid, T. (2017). Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.091>
- Pavlatou, M. G., Mastorakos, G., Lekakis, I., Liatis, S., Vamvakou, G., Zoumakis, E., Papassotiriou, I., Rabavilas, A. D., Katsilambros, N., & Chrousos, G. P. (2008). Chronic administration of an angiotensin II receptor antagonist resets the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and improves the affect of patients with diabetes mellitus type 2: Preliminary results. *Stress*, 11(1), 62–72. <https://doi.org/10.1080/10253890701476621>
- Pêgo, J. M., Sousa, J. C., Almeida, O., & Sousa, N. (2009). Stress and the Neuroendocrinology of Anxiety Disorders. In *Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment* (pp. 97–118). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2009\\_13](https://doi.org/10.1007/7854_2009_13)
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Ramos, A., & Mormède, P. (1998). Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22(1), 33–57.
- Ranjbar, R., Shafiee, M., Hesari, A., Ferns, G. A., Ghasemi, F., & Avan, A. (2019). The potential therapeutic use of renin–angiotensin system inhibitors in the treatment of inflammatory diseases. *Journal of Cellular Physiology*, 234(3), 2277–2295. <https://doi.org/10.1002/jcp.27205>

- Reinecke, A., Browning, M., Klein Breteler, J., Kappelmann, N., Ressler, K. J., Harmer, C. J., & Craske, M. G. (2018). Angiotensin Regulation of Amygdala Response to Threat in High-Trait-Anxiety Individuals. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 3(10), 826–835. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2018.05.007>
- Roy-Byrne, P. P., Davidson, K. W., Kessler, R. C., Asmundson, G. J. G., Goodwin, R. D., Kubzansky, L., Lydiard, R. B., Massie, M. J., Katon, W., Laden, S. K., & Stein, M. B. (2008). Anxiety disorders and comorbid medical illness. *General Hospital Psychiatry*, 30(3), 208–225. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2007.12.006>
- Saavedra, J. M. (2012a). Angiotensin II AT1 Receptor Blockers Ameliorate Inflammatory Stress: A Beneficial Effect for the Treatment of Brain Disorders. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32(5), 667–681. <https://doi.org/10.1007/s10571-011-9754-6>
- Saavedra, J. M. (2012b). Angiotensin II AT1 receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. *Clinical Science*, 123(10), 567–590. <https://doi.org/10.1042/CS20120078>
- Saavedra, J. M. (2017). Beneficial effects of Angiotensin II receptor blockers in brain disorders. *Pharmacological Research*, 125, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.06.017>
- Saavedra, J. M., Ando, H., Armando, I., Baiardi, G., Bregonzio, C., Jezova, M., & Zhou, J. (2004). Brain angiotensin II, an Important Stress Hormone: Regulatory Sites and Therapeutic Opportunities. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1018, 76–84. <https://doi.org/10.1196/annals.1296.009>
- Saavedra, J. M., Ando, H., Armando, I., Baiardi, G., Bregonzio, C., Juorio, A., & Macova, M. (2005). Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT1 receptor antagonists. *Regulatory Peptides*, 128(3), 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.12.015>
- Saavedra, J. M., Armando, I., Bregonzio, C., Juorio, A., Macova, M., Pavel, J., & Sanchez-Lemus, E. (2006). A Centrally Acting, Anxiolytic Angiotensin II AT1 Receptor Antagonist Prevents the Isolation Stress-Induced Decrease in Cortical CRF1 Receptor and Benzodiazepine Binding. *Neuropsychopharmacology*, 31(6), 1123–1134.

<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300921>

- Saavedra, J. M., & Benicky, J. (2007). Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. *Stress*, 10(2), 185–193. <https://doi.org/10.1080/10253890701350735>
- Saavedra, J. M., Sánchez-Lemus, E., & Benicky, J. (2011). Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. *Psychoneuroendocrinology*, 36(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.10.001>
- Salviano, M., Ferreira, G., Greidinger, M., Couto, K., Landeira-Fernandez, J., & Cruz, A. P. de M. (2014). Behavioral Evaluation of Male and Female Carioca High- and Low-Freezing Rats. *Temas Em Psicologia*, 22(3), 663–675. <https://doi.org/10.9788/TP2014.3-11>
- Sareen, J., Jacobi, F., Cox, B. J., Belik, S.-L., Clara, I., & Stein, M. B. (2006). Disability and Poor Quality of Life Associated With Comorbid Anxiety Disorders and Physical Conditions. *Archives of Internal Medicine*, 166, 2109–2116.
- Savaskan, E. (2005). The Role of the Brain Renin-Angiotensin System in Neurodegenerative Disorders. *Current Alzheimer Research*, 2(1), 29–35. <https://doi.org/10.2174/1567205052772740>
- Shad, M. U. (2020). Is there an association between anxiety symptoms and valsartan treatment? *Journal of Affective Disorders*, 261, 111–112. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.10.004>
- Sharma, H. S. (1987). Effect of captopril (a converting enzyme inhibitor) on blood-brain barrier permeability and cerebral blood flow in normotensive rats. *Neuropharmacology*, 26(1), 85–92. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(87\)90049-9](https://doi.org/10.1016/0028-3908(87)90049-9)
- Silva, I. V. G., de Figueiredo, R. C., & Rios, D. R. A. (2019). Effect of Different Classes of Antihypertensive Drugs on Endothelial Function and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3458. <https://doi.org/10.3390/ijms20143458>
- Song, M. A., Dasgupta, C., & Zhang, L. (2015). Chronic Losartan Treatment Up-Regulates AT1R and Increases the Heart Vulnerability to Acute Onset of Ischemia and Reperfusion Injury in Male Rats. *PLoS ONE*, 10(7), e0132712.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132712>

- Steimer, T. (2011). Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 13(4), 495–506. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2011.13.4/tsteimer>
- Swaab, D. F., Bao, A.-M., & Lucassen, P. J. (2005). The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews*, 4(2), 141–194. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.03.003>
- Üresin, Y., Erbas, B., Özek, M., Özkök, E., & Gürol, A. O. (2004). Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 5(2), 93–96. <https://doi.org/10.3317/jraas.2004.017>
- Vian, J., Pereira, C., Chavarria, V., Köhler, C., Stubbs, B., Quevedo, J., Kim, S.-W., Carvalho, A. F., Berk, M., & Fernandes, B. S. (2017). The renin-angiotensin system: a possible new target for depression. *BMC Medicine*, 15(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0916-3>
- Villapol, S., & Saavedra, J. M. (2014). Neuroprotective Effects of Angiotensin Receptor Blockers. *American Journal of Hypertension*. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu197>
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Wang, J. M., Tan, J., & Leenen, F. H. H. (2003). Central Nervous System Blockade by Peripheral Administration of AT1 Receptor Blockers. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 41(4), 593–599. <https://doi.org/10.1097/00005344-200304000-00012>
- Wang, L., Hiller, H., Smith, J. A., de Kloet, A. D., & Krause, E. G. (2016). Angiotensin type 1a receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus control cardiovascular reactivity and anxiety-like behavior in male mice. *Physiological Genomics*, 48(9), 667–676. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00029.2016>
- Wincewicz, D., & Braszko, J. J. (2017). Validation of Brain Angiotensin System Blockade as a Novel Drug Target in Pharmacological Treatment of Neuropsychiatric Disorders. *Pharmacopsychiatry*, 50(6), 233–247.

<https://doi.org/10.1055/s-0043-112345>

World Health Organization. (2017). *Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates*. <https://doi.org/CC BY-NC-SA 3.0 IGO>

Yaribeygi, H., & Sahraei, H. (2018). Physiological/Neurophysiological Mechanisms Involved in the Formation of Stress Responses. *Neurophysiology*, 50(2), 131–139. [https://doi.org/10.1007/s11062-018-9727-](https://doi.org/10.1007/s11062-018-9727-1)

1

## 9

**ANEXO I – ARTIGO**

**THE ASSOCIATION BETWEEN THE RENIN-ANGIOTENSIN  
SYSTEM AND THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL  
AXIS IN ANXIETY DISORDERS: A SYSTEMATIC REVIEW  
OF ANIMAL STUDIES**

**Balthazar, L.; Lages, Y. V. M.; Romano, V. C.; Landeira-Fernandez, J.;  
Krahe, T. E.**

Department of Psychology, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro, Rio  
de Janeiro, Brazil.



## ABSTRACT

Anxiety is characterized as the emotional response in anticipation of a future threat. This hypervigilant state comprehends a cascade of neuroendocrine and physiological processes, involving the renin-angiotensin system (RAS) and hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA). Excessive and chronic anxiety may ultimately lead to the development of anxiety disorders. This systematic review aimed to investigate experimental studies using animal models that explored the relationship between the RAS and the HPA axis in anxiety disorders. Studies in rats and mice show that the overactivation of the RAS and HPA axis triggers several neuroendocrine reactions, mainly mediated by AT1 receptors, which promote anxiety-like behaviors and positive feedback for its hyperactivation. On the contrary, the administration of antihypertensive drugs propitiated the regulation of the RAS and HPA axis, which maintains homeostasis even amid aversive situations. Thus, preclinical evidence indicates that the modulation of the RAS and the HPA axis by the means of AT1 antagonists antihypertensives produce anxiolytic effects in animals and may be considered a potential target for the treatment of anxiety disorders.

**Keywords:** Systematic review; renin-angiotensin system; hypothalamic-pituitary-adrenal axis; anxiety disorders; animal models

## 1. INTRODUCTION

Anxiety disorders (AD), along with depression, are considered the most prevalent mental disorders in the world. According to the World Health Organization, AD affect at least 264 million people worldwide (World Health Organization, 2017). As defined by the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5), anxiety is an emotional response in anticipation of a future threat, associated with muscle tension and vigilance (American Psychiatric Association, 2014). When facing the uncertainty of a stressful and/or threatening situation, the body produces adaptive responses (McEwen, 2007) involving the activation of the sympathetic nervous system (SNS), the renin-angiotensin system (RAS), and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) (Fink, 2017; Yaribeygi and Sahraei, 2018).

Anxiety and stress responses in mammals are characterized by an activation of  $\beta$ -adrenergic receptors in the SNS that triggers a cascade of signaling events leading to increased respiratory rate, pupil dilation, sweating, adrenaline, and noradrenaline release, among other responses (Joëls et al., 2012; Koeppen and Stanton, 2017). Additionally, endogenous catecholaminergic stimulation of  $\beta$ -adrenergic receptors leads to the production of renin which causes an increase in circulating and cerebral angiotensin II (ANG II) (Armando et al., 2007; Koeppen and Stanton, 2017; Saavedra and Benicky, 2007). ANG II, the main peptide of RAS - known as the stress hormone - is a critical mediator of blood pressure and body fluid homeostasis, and can be found in different tissues, such as the heart, kidneys, brain, and adrenal glands (Gard, 2002; Nehme et al., 2019; Saavedra et al., 2004).

The increase of ANG II activates AT1 and AT2 receptors generating neurophysiological responses by stimulation of the HPA axis and the peripheral and central RAS (Aguilera, 2017, 2011; Nehme et al., 2019; Saavedra and Pavel, 2005). These receptors have opposite functions, as the AT1 promotes vasoconstriction and sodium retention, and the AT2 induces vasodilation and natriuresis (Culman et al., 2002; Gard, 2002; Gross et al., 2000; Nehme et al., 2019). However, there is a predominance of AT1 receptors, which are responsible for most of the actions of the RAS (Culman et al., 2002; Gard, 2002). They are also present on a large scale in several brain regions (Allen et al., 2000; Tsutsumi and Saavedra, 1991), mainly in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) (McKinley et al., 2003). When activated by ANG II, the AT1

receptors stimulate the release of the corticotropin-releasing hormone (CRH – also called corticotropin-releasing factor, CRF) by the neurosecretory cells in the PVN (Armando et al., 2007) activating the entire cascade of the HPA axis (Faravelli et al., 2012; Graeff and Junior, 2010) and resulting in the release of cortisol (cortisol in humans, corticosterone in rodents) and other glucocorticoids into the bloodstream (de Kloet et al., 2005; Faravelli et al., 2012).

In anxiety disorders and stress, there is a persistent activation of both RAS and the HPA axis, causing a vicious cycle and, as a consequence, decompensation of organism homeostasis (Bali and Jaggi, 2013; Saavedra et al., 2011; Wincewicz and Braszko, 2017). This imbalance can lead to the development of other complications, such as increased inflammatory processes, increased blood pressure, cardiorespiratory disorders, cognitive and vascular damage, among others (Forrester et al., 2018; Härter et al., 2003; Michopoulos et al., 2017; Roy-Byrne et al., 2008). While the modulation of the RAS and HPA axis by antihypertensive drugs has been effective in the treatment of several pathologies such as post-traumatic stress disorder (Khoury et al., 2012), diabetes mellitus (Pavlatou et al., 2008), and stroke prevention (Papademetriou et al., 2004), clinical evidence supporting their application for the treatment of anxiety disorders is not as conclusive (Reinecke et al., 2018; Shad, 2020). However, some preclinical studies indicate that antihypertensives produce anxiolytic effects in rodents subjected to stressful stimuli (Kumar et al., 2015; Pechlivanova et al., 2011; Ranjbar et al., 2018), suggesting that the AT1 and AT2 receptors might be potential therapeutical targets to alleviate the symptoms of anxiety related disorders. Thus, the present study aimed to systematically review the literature on animal studies that investigated the role of the RAS and the HPA axis in anxiety.

## 2. METHODS

### 2.1. PROTOCOL AND REGISTRATION

The present study was registered on PROSPERO (*International Prospective Register of Systematic Reviews*) under the protocol nº CRD42021231471.

### 2.2. SEARCH STRATEGY

A systematic search was made according to the guidelines of PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) (Liberati et al., 2009), and was conducted using the following databases: MEDLINE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Embase (<https://www.embase.com/>), and Web of Science (<https://www.isiknowledge.com>). Studies published until December 2020 were considered and a few authors were contacted for the availability of inaccessible articles.

The search strategy was based on the following keywords: renin-angiotensin system, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and anxiety. All anxiety disorders categorized in the DMS-5 were considered (American Psychiatric Association, 2014). MeSH (*Medical Subject Headings*) and Emtree (*Embase subject headings*) terms were used in the development of the search terms. Details of the search strategy can be found in the Supplementary Material (**Table S1**).

### 2.3. STUDY SELECTION CRITERIA

The search was limited to preclinical and original experiments in both male and female non-human animals. The inclusion criteria were: (1) studies written in English, Portuguese, Spanish or French; (2) preclinical/experimental studies performed on non-human animals; and (3) the mention of the relationship between the RAS, HPA axis, and an anxiety disorder. The exclusion criteria were: (1) clinical/experimental/qualitative studies on humans; (2) not mentioning all the RAS, HPA axis, and an anxiety disorder; and (3) reviews, posters, conference abstracts, oral speeches, commentaries, or theoretical papers.

## 2.4. STUDY SELECTION

Duplicates of all databases were removed. Titles and abstracts were independently screened by two authors (LB and YL) according to the inclusion and exclusion criteria. Articles interpreted as compatible were selected for a full-text analysis to determine whether they were or were not within the inclusion criteria. Also, the references of selected studies were screened in search for additional articles that met the inclusion criteria. If a divergence of opinions emerged, a third author (VR) was consulted to discuss and reach an agreement between the authors.

## 2.5. DATA EXTRACTION AND ANALYSES

After selecting the studies, the data was extracted and organized into a table. The following information was collected: (1) author; (2) publication date; (3) species; (4) sex; (5) age, body weight; (6) treatment; (7) behavioral test/type of stress; and (8) results (**Table 1**).

## 2.6. QUALITY OF EVIDENCE

The evaluation of the risk of bias of the studies was carried out by two authors (LB and YL) and in the case of divergence of opinions, a third author (VR) was consulted (Lages et al., 2021). The analysis was performed using a modified risk of bias table derived from SYRCLE (*Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation*) (Hooijmans et al., 2014). Briefly, ten questions were assembled and subdivided into different assessment categories. Each of these questions were then rated as “YES” (low risk of bias), “NO” (high risk of bias), and “UNCLEAR” (unclear risk of bias – i.e., if there are insufficient data to assess risk of bias). A complete table of evaluation can be found in the Supplementary Material (**Table S2**).

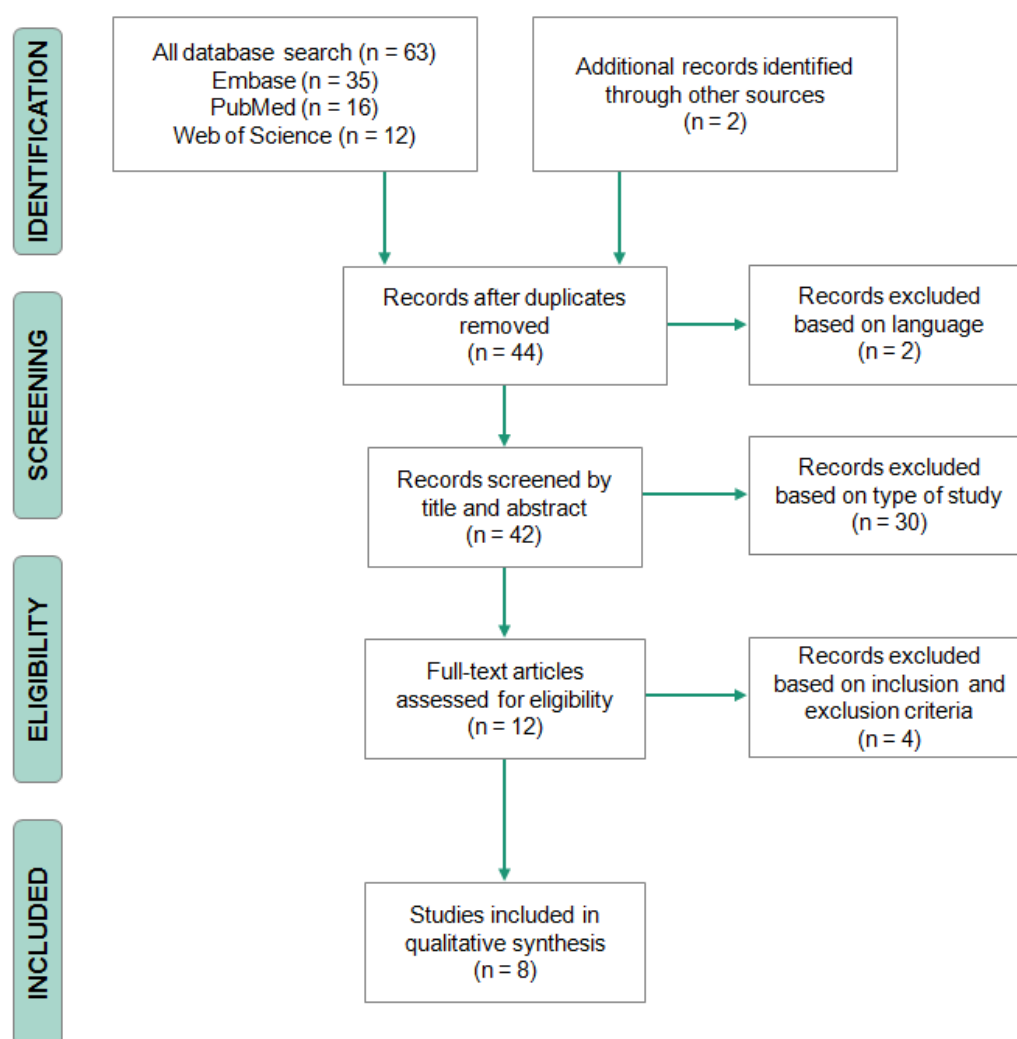
## 3. RESULTS

### 3.1. STUDY SELECTION

After the selection process based on the inclusion criteria, 8 (Armando et al., 2001; Aswar et al., 2017; de Kloet et al., 2020, 2017; Edwards et al., 1999;

Hlavacova and Jezova, 2008a, 2008b; Saavedra et al., 2006) experimental studies on animal models were considered (**Figure 1**). Two papers were selected through the search for the production of specific authors (Armando et al., 2001; Saavedra et al., 2006). Studies were published between 1999 and 2020.

**Figure 1** – Flow diagram of studies selection based on PRISMA guidelines (Liberati et al., 2009).



### 3.1.1. SPECIES, SEX, AND TREATMENT

All selected studies used rodents as experimental animals: six with rats (Armando et al., 2001; Aswar et al., 2017; Edwards et al., 1999; Hlavacova and Jezova, 2008a, 2008b; Saavedra et al., 2006) and two with genetically modified mice (de Kloet et al., 2020, 2017). Four studies used only males (Armando et al., 2001; Hlavacova and Jezova, 2008a, 2008b; Saavedra et al., 2006), three used both males and females (Aswar et al., 2017; de Kloet et al., 2017; Edwards et al., 1999), and one used only females (de Kloet et al., 2020) (**Table 1**).

Different drugs were studied, as well as the route of administration and the duration of treatments (**Table 1**). Chronic treatments were done by the use of subcutaneous osmotic minipumps (Armando et al., 2001; Hlavacova and Jezova, 2008a; Saavedra et al., 2006) and via gavage (Aswar et al., 2017); whereas acute ones via subcutaneous injections (Hlavacova and Jezova, 2008b) and bath applications during *in vitro* electrophysiology experiments (de Kloet et al., 2017). Two studies didn't use any type of pharmacological treatment (de Kloet et al., 2020; Edwards et al., 1999).

Table 1 also shows that the majority of drugs used in the studies were angiotensin AT1 receptor blockers (ARB) with antihypertensive activity (candesartan (Armando et al., 2001; Saavedra et al., 2006), losartan (de Kloet et al., 2017), and telmisartan (Aswar et al., 2017)). Moreover, one study made use of eplerenone (Hlavacova and Jezova, 2008b), a mineralocorticoid receptor antagonist, and in two others the treatment consisted of the application of the anxiogenic drugs, aldosterone (Hlavacova and Jezova, 2008a) and ANG II (de Kloet et al., 2017).

### 3.1.2. BEHAVIORAL TESTS AND TYPE OF STRESS

One of the evaluated parameters was the anxiety-like behavior, through behavioral tests (**Table 1**). Six studies (Aswar et al., 2017; de Kloet et al., 2020, 2017; Hlavacova and Jezova, 2008a, 2008b; Saavedra et al., 2006) used the elevated plus maze (EPM), which is one of the main tests to assess anxiogenic/anxiolytic responses (Walf and Frye, 2007). In addition to the EPM, other tests were performed, such as the open field test (Aswar et al., 2017; Hlavacova and Jezova, 2008a), forced swimming (Aswar et al., 2017), light-dark box, and novelty-induced hypophagia (de Kloet et al., 2020). Some studies also

submitted the animals to a certain type of stress, such as cold stress and maternal deprivation (Edwards et al., 1999), isolation stress (Armando et al., 2001; Saavedra et al., 2006), and restraint challenge (de Kloet et al., 2020).



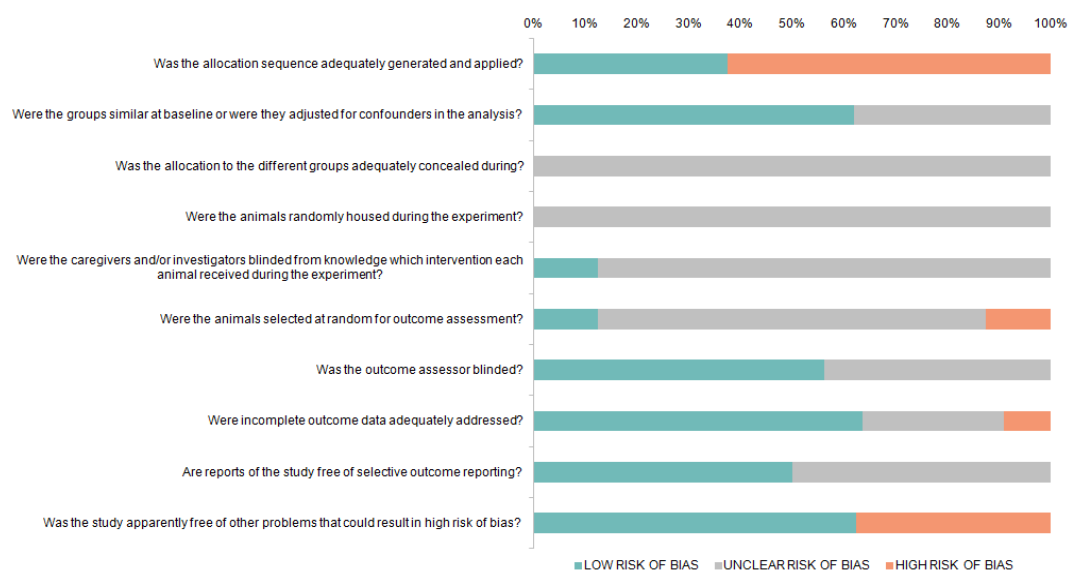
**Table 1** – Characteristics of included studies in the systematic review.

AUTHOR	YEAR	SPECIES	SEX	AGE/BODY WEIGHT	TREATMENT	BEHAVIORAL TEST/TYPE OF STRESS	RESULTS
PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1912268/CA	Erds, <i>et al.</i>	1999	Rats: ▪ cLH (congenital learned helpless) ▪ cNLH (congenital non learned helpless)	Male Female	▪ Neonatal (7, 14 e 21 days) ▪ Adults (250-300g)	Cold stress Maternal deprivation	▪ ↑ Plasma corticosterone concentrations in adult animals. ▪ ↑ Plasma renin activity in cLH rats and ↓ in cNLH rats.
	Ando, <i>et al.</i>	2001	Wistar rats	Male	10 weeks (250-300g) Osmotic minipump: ▪ Candesartan (0.1, 0.5 or 1.0mg/kg/14 days) ▪ Vehicle	Isolation stress (metabolic cage 24h)	▪ ↑ Expression of AT2 receptors in the adrenal gland. ▪ ↓ AT1 receptors binding in the PVN and the subfornical organ. ▪ ↓ Pituitary ACTH and AVP concentrations. ▪ ↓ Adrenal gland catecholamines, corticosterone, and aldosterone concentrations. ▪ ↓ Urinary excretion of catecholamines, corticosterone, aldosterone, and AVP.
	Saavedra, <i>et al.</i>	2006	Wistar Hannover rats	Male	8 weeks Osmotic minipump: ▪ Candesartan (0.5mg/kg/14 days) ▪ Vehicle	Isolation stress (metabolic cage 24h) Elevated plus maze	▪ ↑ CRF2 receptor expression in the lateral septum. ▪ ↑ Number of entries and the time spent into the open arms of the elevated plus maze. ▪ Prevented the ↑ in TH mRNA. ▪ ↓ AT1 receptors' binding in the PVN, the subfornical organ, the nucleus of the solitary tract and the area postrema. ▪ Prevented the ↓ in CRF1 binding in cortical areas. ▪ Prevented the ↓ in AT2 receptors binding in the locus coeruleus and the inferior olive.
	Hlavacova & Jezova	2008a	Wistar rats	Male	7 weeks (150-175g) Osmotic minipump: ▪ Aldosterone (2µg/100g/14 days) ▪ Vehicle	Open field Elevated plus maze	▪ ↑ Daily water intake. ▪ ↑ Plasma aldosterone concentrations. ▪ ↓ Plasma renin activity concentrations. ▪ ↓ Number of entries and time spent in the central area of the open field. ▪ ↓ Frequency of entries and time spent in the open arms of the elevated plus maze. ▪ No alterations in both plasma and adrenal gland corticosterone concentrations. ▪ No alterations in plasma ACTH concentrations.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1912268/CA	Hlavacova & Jirova	2008b	Wistar rats	Male	175-200g	Subcutaneous injection 2h before tests: ▪ Eplerenone (100mg/kg) ▪ Vehicle	Elevated plus maze	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↑ Plasma aldosterone concentrations.</li> <li>▪ ↑ Exploration and risk assessment behavior in the elevated plus maze.</li> <li>▪ A trend toward the ↑ in plasma renin activity.</li> <li>▪ No alterations in plasma ACTH and corticosterone concentrations.</li> <li>▪ No effect on frequency of entries and time spent in the open arms of the elevated plus maze.</li> </ul>
	Goet, et al.	2017	Mice (C57BL/6J): ▪ AT1aR-Cre ▪ AT1aR-tdTomato	Male Female	8-10 weeks	▪ ANG II (100 and 500µM) ▪ Losartan (10µM)	Elevated plus maze Mild stressor as the tail-blood collection	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↑ Expression of AT1aR in the PVN excited by Ang-II and ↓ when blocked by losartan.</li> <li>▪ ↑ Systolic blood pressure by stimulation of AT1aR in the PVN.</li> <li>▪ ↑ Percentage of time spent in the open arms of the elevated plus maze, by inhibition of AT1aR in the PVN.</li> <li>▪ ↑ Plasma ACTH, corticosterone, TSH, and T4 concentrations, by the stimulation of AT1aR in the PVN.</li> <li>▪ ↓ Plasma corticosterone and TSH concentrations, by the inhibition of AT1aR in the PVN.</li> <li>▪ The predominance of AT1aRs in the parvocellular neurosecretory CRH and TRH neurons.</li> </ul>
	Aswar, et al.	2017	Wistar rats	Male Female	200-250g	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Streptozotocin to induce diabetes (30mg/kg/ip; 21 days)</li> <li>▪ Metformin (200mg/kg/po; 21 days)</li> <li>▪ Fluoxetine (20mg/kg/po; 21 days)</li> <li>▪ Telmisartan (0,05mg/kg/po; 21 days)</li> <li>▪ Vehicle</li> </ul>	Forced swim test Open field Elevated plus maze Locomotor activity	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↑ Ambulation, rearing and grooming in the open field in FLX, TMS, TMS + MET in treatment groups.</li> <li>▪ ↑ Percentage in entries and time spent in open arms of the elevated plus maze in treatment groups.</li> <li>▪ ↑ Blood glucose levels and serum corticosterone concentrations in diabetic animals.</li> <li>▪ ↓ Total immobility time in the forced swim test in treatment groups.</li> <li>▪ ↓ Ambulation, rearing, and grooming activities in the open field in diabetic animals.</li> <li>▪ ↓ Serum corticosterone concentrations in TMS and TMS + MET.</li> <li>▪ ↓ Serum IL-6 concentrations in treatment groups.</li> <li>▪ ↓ Serum IL-1β concentrations in FLX, TMS and TMS + MET.</li> </ul>
	de Kloet, et al.	2020	Mice ACE2 knock-in: ▪ homozygous (HOM ACE2KI) ▪ heterozygous (HET ACE2KI) ▪ wild type (WT)	Female	8-12 weeks	—————	Elevated plus maze Light-dark box Novelty-induced hypophagia Restraint challenge	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ↑ ACE2 mRNA expression in the amygdala, hypothalamus, pituitary, and adrenal gland in HOM and HET ACE2KI.</li> <li>▪ ↑ Percentage of time and entries in open arms of the elevated plus maze in HOM ACE2KI.</li> <li>▪ ↑ Percentage time and entries in light of the light-dark box in HOM and HET ACE2KI.</li> <li>▪ ↓ Latency to consume the graham cracker in the novelty-induced hypophagia in HOM and HET ACE2KI.</li> <li>▪ No alterations in plasma corticosterone concentrations.</li> </ul>

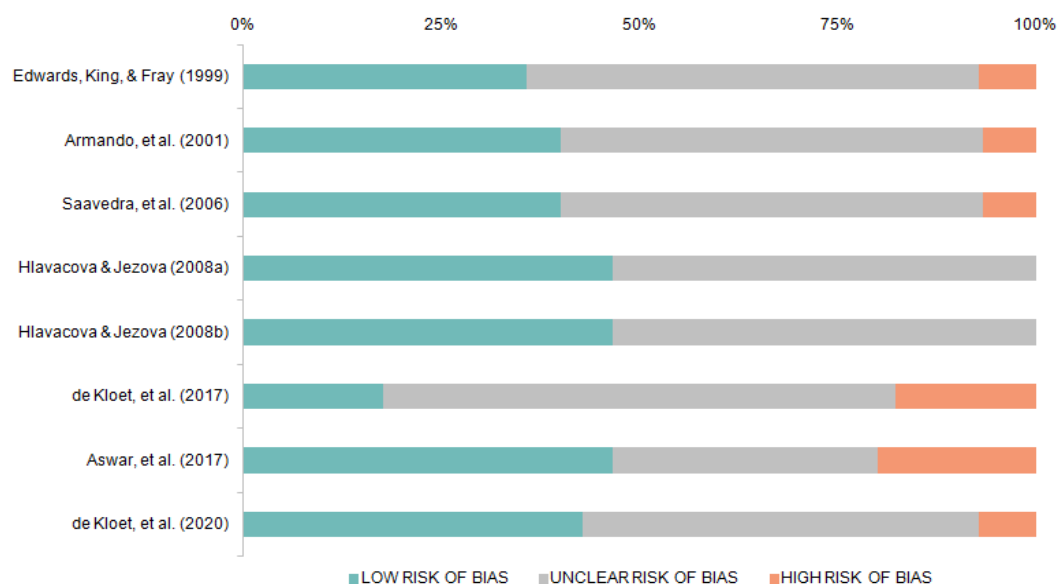
### 3.1. RISK OF BIAS ASSESSMENT

The quality of the selected experimental studies was made based on a table of risks of bias from SYRCLE (**Table S2**). None of the ten categories had a 100% probability of low risk of bias; most of them showed an unclear risk of bias, varying between 27% – 100% (**Figure 2**). The last category, which evaluates potential risks that could not be assessed before, presented 3 studies with a high probability of risk of bias since they failed to detail information, such as the number of animals used in each experiment (Edwards et al., 1999) and their sex (Aswar et al., 2017; de Kloet et al., 2017) (**Figure 2 and Table S2**).



**Figure 2** – Evaluation of the risk of bias by ten categories based on SYRCLE (Hooijmans et al., 2014).

When evaluating each study individually, the unclear risks of bias decreased, varying from 33% – 65% (**Figure 3**). Both studies by Hlavacova & Jezova (2008) showed no unclear risk of bias and had a 47% probability of low risk. Aswar, *et al.* (2017), presented the highest probability of high risk of bias, 20%. Also, the study by de Kloet, *et al.* (2017), presented the highest unclear risk of bias, 65% (**Figure 3 and Table S2**).



**Figure 3** – Evaluation of each study risk of bias by ten categories based on SYRCLE (Hooijmans et al., 2014).

#### 4. DISCUSSION

This systematic review analyzed studies that investigated the relationship between the RAS and the HPA axis in the modulation of anxiety in animal models. Taken together, the results indicate that hyperactivation of both the RAS and HPA axis implicates in a higher expression of anxiety-like behaviors and neurophysiological effects associated with stress.

Regarding studies that made use of antihypertensive drugs, there is a consensus that angiotensin AT1 receptor blockers modulate anxiety-like behaviors. Animals treated with candesartan (Saavedra et al., 2006) and telmisartan (Aswar et al., 2017) had a significant increase in the percentage of open arms entries in the elevated plus maze. In comparison, animals treated with aldosterone (Hlavacova and Jezova, 2008a) had a decrease in the number of entries in the open arms. In the open field test, an anxiogenic effect was observed in animals treated with aldosterone (Hlavacova and Jezova, 2008a), while animals treated with telmisartan (Aswar et al., 2017) showed increased exploratory behavior. The angiotensin-converting enzyme (ACE) converts angiotensin I to ANG II (Bader, 2010). Yet, the ANG II can also be cleaved by the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) (Bader, 2010; Mohammed et al., 2020; Patel et al., 2017). The responses mediated by ACE2 counterbalance those of

ACE, acting as a vasodilator and anti-inflammatory (Jackson et al., 2018; Mohammed et al., 2020), and possibly exerting anxiolytic effects (Wang et al., 2016). de Kloet *et al.* (2020) used female mice genetically modified to express a large amount of ACE2 and reported a decrease in anxiety-like behaviors in the elevated plus maze, light-dark box, and novelty-induced hypophagia (de Kloet et al., 2020). In the same manner, the consequences of the activation of AT1 receptors are counterbalanced by the vasodilating effects of the AT2 receptors (Bader, 2010; Nehme et al., 2019). For example, the antihypertensive candesartan, by blocking AT1 receptors, produced either an increase (Armando et al., 2001) or the maintenance (Saavedra et al., 2006) in the expression of AT2 receptors in animals exposed to isolation stress. Moreover, the study by de Kloet, *et al.* (2017) observed that the stimulation of AT1 receptors in the PVN, through optogenetic techniques, increased the animals' systolic blood pressure, in addition to increasing the levels of corticosterone, thyroid-stimulating hormone (TSH) and T4 (de Kloet et al., 2017). In the same study, the predominance of AT1 receptors in PVN neurosecretory cells was confirmed, when triggered by ANG II *in vitro*. However, when the antihypertensive losartan was used, the effects of AT1 by ANG II were blocked. These results corroborate those found in studies that used candesartan for 14 days (Armando et al., 2001; Saavedra et al., 2006), showing a decrease in the expression of AT1 in the PVN and in the subfornical organ, after exposing the animals to a stressful situation. This indicates that the use of an ARB antihypertensive can regulate the hyperactivity of both the RAS and the HPA axis.

Glucocorticoids regulate the HPA axis by negative feedback in the hypothalamus and the pituitary, decreasing the release of CRH and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (Faravelli et al., 2012). Stress disrupts this mechanism, causing a constant activation of the axis and release of hormones into the bloodstream (Leonard, 2005). Treatment with chronic candesartan prevented changes in CRF1 receptors from occurring as a consequence of isolation stress (Saavedra et al., 2006) and decreased the concentrations of ACTH and vasopressin (AVP) in the pituitary (Armando et al., 2001), which prevented the dysregulation of the HPA axis. In contrast, animals that were submitted to behavioral tests and stressful stimuli showed a higher concentration of corticosterone (Aswar et al., 2017; Edwards et al., 1999; Hlavacova and Jezova, 2008a), as well as renin (Edwards et al., 1999), indicating hyperactivity of

the HPA axis. However, animals treated with an antihypertensive exhibited low concentrations (Armando et al., 2001; Aswar et al., 2017) of both molecules.

Aldosterone is the last component of the RAS, being an important hormone responsible for stimulating sodium reabsorption ( $\text{Na}^+$ ) and potassium secretion ( $\text{K}^+$ ) (Koeppen and Stanton, 2017; Patel et al., 2017). Chronic administration of aldosterone for 14 days resulted in an increase in its plasma concentrations and the water intake (Hlavacova and Jezova, 2008a). In the same way, the acute treatment with eplerenone, a mineralocorticoid receptor antagonist, also led to an increase in plasma aldosterone (Hlavacova and Jezova, 2008b). Contrary to these results, continuous treatment with candesartan decreased aldosterone concentrations in both urine and adrenal glands (Armando et al., 2001), in animals subjected to isolation stress. When the AT1 receptors, located in the adrenal medulla and the catecholaminergic neurons in the brain, are activated by ANG II, catecholamines (epinephrine and norepinephrine) are released into the organism (Aguilera, 2017; Saavedra and Benicky, 2007). Üresin *et al.* (2020) subjected a group of animals to chronic stress and observed higher plasma concentrations of epinephrine and norepinephrine (Üresin et al., 2004). Moreover, in another group of animals that were treated chronically with losartan, the increasing concentrations of these catecholamines were prevented. This same effect was observed in animals chronically treated with candesartan, resulting in a decrease in urine and the adrenal glands' concentrations of catecholamines (Armando et al., 2001).

Even though the 8 selected studies demonstrated an unclear risk of bias in most evaluated categories, the results obtained from all of them showed similar outcomes and conclusions. In sum, the hyperactivation of the RAS and HPA axis triggers several neuroendocrine reactions, generating anxiety-like behaviors and promoting a cycle of its hyperactivation. The administration of antihypertensive drugs in four studies revealed regulation of the RAS and HPA axis, which maintains homeostasis even amid aversive situations. The anxiolytic effects of these drugs indicate a potential treatment for anxiety and mood disorders associated with stress.

Overall, we consider that the results compiled in this systematic review can benefit and fill the gaps in scientific, clinical, and psychological knowledge regarding anxiety disorders. In this review, studies that explored the relationship between the RAS and HPA axis, in animal models, showed the detrimental

consequences of the hyperactivation of both systems, during stressful events. Likewise, the present results demonstrated that the use of AT1 antagonists antihypertensive (ARBs) have anxiolytic effects, regulating both the RAS and the HPA axis, proving to be a potential therapeutical target for anxiety disorders. Nonetheless, future studies should be carried out for better clarification of the dosage, administration, and duration of treatment of these antihypertensives to other clinical cases, beyond the ones with hypertension.

## 5. DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors report no declarations of interest.

## 6. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## 7. REFERENCES

- Aguilera, G., 2017. Stress, Angiotensin, and Cognate Receptors, in: *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology*. Elsevier, pp. 243–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802175-0.00024-3>
- Aguilera, G., 2011. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by neuropeptides. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 7, 327–336. <https://doi.org/10.1515/HMBCI.2011.123>
- Allen, A.M., Zhuo, J., Mendelsohn, F.A.O., 2000. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am. J. Hypertens.* 13, S31–S38. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(99\)00249-6](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(99)00249-6)
- American Psychiatric Association, 2014. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5*, 5th ed.
- Armando, I., Carranza, A., Nishimura, Y., Hoe, K.-L., Barontini, M., Terrón, J.A., Falcón-Neri, A., Ito, T., Juorio, A. V., Saavedra, J.M., 2001. Peripheral Administration of an Angiotensin II AT1 Receptor Antagonist Decreases the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Isolation Stress. *Endocrinology* 142, 3880–3889. <https://doi.org/10.1210/endo.142.9.8366>
- Armando, I., Volpi, S., Aguilera, G., Saavedra, J.M., 2007. Angiotensin II AT1 receptor blockade prevents the hypothalamic corticotropin-releasing factor response to isolation stress. *Brain Res.* 1142, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.037>
- Aswar, U., Chepurwar, S., Shintre, S., Aswar, M., 2017. Telmisartan attenuates diabetes induced depression in rats. *Pharmacol.*

- Reports 69, 358–364.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.12.004>
- Bader, M., 2010. Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems: Targets for Pharmacological Therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 439–465.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105610>
- Bali, A., Jaggi, A.S., 2013. Angiotensin as stress mediator: Role of its receptor and interrelationships among other stress mediators and receptors. *Pharmacol. Res.* 76, 49–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.07.004>
- Culman, J., Blume, A., Gohlke, P., Unger, T., 2002. The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT1-receptor blockers. *J. Hum. Hypertens.* 16, S64–S70.  
<https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001442>
- de Kloet, A.D., Cahill, K.M., Scott, K.A., Krause, E.G., 2020. Overexpression of angiotensin converting enzyme 2 reduces anxiety-like behavior in female mice. *Physiol. Behav.* 224, 113002.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113002>
- de Kloet, A.D., Wang, L., Pitra, S., Hiller, H., Smith, J.A., Tan, Y., Nguyen, D., Cahill, K.M., Sumners, C., Stern, J.E., Krause, E.G., 2017. A Unique “Angiotensin-Sensitive” Neuronal Population Coordinates Neuroendocrine, Cardiovascular, and Behavioral Responses to Stress. *J. Neurosci.* 37, 3478–3490.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3674-16.2017>
- de Kloet, E.R., Joëls, M., Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 463–475.  
<https://doi.org/10.1038/nrn1683>
- Edwards, E., King, J.A., Fray, J.C.S., 1999. Increased basal activity of the HPA axis and renin-angiotensin system in congenital learned helpless rats exposed to stress early in development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17, 805–812.  
[https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(99\)00062-3](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(99)00062-3)
- Faravelli, C., Lo Sauro, C., Lelli, L., Pietrini, F., Lazzeretti, L., Godini, L., Benni, L., Fioravanti, G., Alina Talamba, G., Castellini, G., Ricca, V., 2012. The Role of Life Events and HPA Axis in Anxiety Disorders: A Review. *Curr. Pharm. Des.* 18, 5663–5674.  
<https://doi.org/10.2174/138161212803530907>
- Fink, G., 2017. Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology, 1st ed. Academic Press.
- Forrester, S.J., Booz, G.W., Sigmund, C.D., Coffman, T.M., Kawai, T., Rizzo, V., Scalia, R., Eguchi, S., 2018. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 98, 1627–1738.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2017>
- Gard, P.R., 2002. The role of angiotensin II in cognition and behaviour. *Eur. J. Pharmacol.* 438, 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01283-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01283-9)
- Graeff, F.G., Junior, H.Z., 2010. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety and panic. *Psychol. Neurosci.* 3, 3–8. <https://doi.org/10.3922/j.psns.2010.1.002>
- Gross, V., Schunck, W.-H., Honeck, H., Milia, A.F., Kärgel, E., Walther, T., Bader, M., Inagami, T., Schneider, W., Luft, F.C., 2000. Inhibition of pressure natriuresis in mice lacking the AT2 receptor. *Kidney Int.* 57, 191–202. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00820.x>
- Härter, M.C., Conway, K.P., Merikangas, K.R., 2003. Associations between anxiety disorders and physical illness. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 253, 313–320.  
<https://doi.org/10.1007/s00406-003-0449-y>
- Hlavacova, N., Jezova, D., 2008a. Chronic treatment with the mineralocorticoid hormone aldosterone results in increased anxiety-like behavior. *Horm. Behav.* 54, 90–97.  
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.02.004>



- Hlavacova, N., Jezova, D., 2008b. Effect of single treatment with the antihypertensive drug eplerenone on hormone levels and anxiety-like behaviour in rats. *Endocr. Regul.* 42, 147–153.
- Hooijmans, C.R., Rovers, M.M., de Vries, R.B., Leenaars, M., Ritskes-Hoitinga, M., Langendam, M.W., 2014. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med. Res. Methodol.* 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>
- Jackson, L., Eldahshan, W., Fagan, S., Ergul, A., 2018. Within the Brain: The Renin Angiotensin System. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 876. <https://doi.org/10.3390/ijms19030876>
- Joëls, M., Sarabdjitsingh, R.A., Karst, H., 2012. Unraveling the Time Domains of Corticosteroid Hormone Influences on Brain Activity: Rapid, Slow, and Chronic Modes. *Pharmacol. Rev.* 64, 901–938. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005892>
- Khoury, N.M., Marvar, P.J., Gillespie, C.F., Wingo, A., Schwartz, A., Bradley, B., Kramer, M., Ressler, K.J., 2012. The Renin-Angiotensin Pathway in Posttraumatic Stress Disorder. *J. Clin. Psychiatry* 73, 849–855. <https://doi.org/10.4088/JCP.11m07316>
- Koeppen, B.M., Stanton, B.A., 2017. *Berne & Levy Physiology*, 7th ed. Elsevier, Philadelphia, PA.
- Kumar, A., Singh, B., Mishra, J., Sah, S.P., Pottabathini, R., 2015. Neuroprotective mechanism of losartan and its interaction with nimesulide against chronic fatigue stress. *Inflammopharmacology* 23, 291–305. <https://doi.org/10.1007/s10787-015-0238-z>
- Lages, Y.V.M., Rossi, A.D., Krahe, T.E., Landeira-Fernandez, J., 2021. Effect of chronic unpredictable mild stress on the expression profile of serotonin receptors in rats and mice: a meta-analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 124, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.01.020>
- Leonard, B.E., 2005. The HPA and immune axes in stress: the involvement of the serotonergic system. *Eur. Psychiatry* 20, S302–S306. [https://doi.org/10.1016/S0924-9338\(05\)80180-4](https://doi.org/10.1016/S0924-9338(05)80180-4)
- Liberati, A., Altman, D.G., Tetzlaff, J., Mulrow, C., Gøtzsche, P.C., Ioannidis, J.P.A., Clarke, M., Devereaux, P.J., Kleijnen, J., Moher, D., 2009. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: Explanation and elaboration. *PLoS Med.* 6, e1000100–undefined. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000100>
- McEwen, B.S., 2007. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiol. Rev.* 87, 873–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006>
- McKinley, M.J., Albiston, A.L., Allen, A.M., Mathai, M.L., May, C.N., McAllen, R.M., Oldfield, B.J., Mendelsohn, F.A.O., Chai, S.Y., 2003. The brain renin–angiotensin system: location and physiological roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 901–918. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00306-0)
- Michopoulos, V., Powers, A., Gillespie, C.F., Ressler, K.J., Jovanovic, T., 2017. Inflammation in Fear- and Anxiety-Based Disorders: PTSD, GAD, and Beyond. *Neuropsychopharmacology* 42, 254–270. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.146>
- Mohammed, M., Berdasco, C., Lazartigues, E., 2020. Brain angiotensin converting enzyme-2 in central cardiovascular regulation. *Clin. Sci.* 134, 2535–2547. <https://doi.org/10.1042/CS20200483>
- Nehme, A., Zouein, F.A., Zayeri, Z.D., Zibara, K., 2019. An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 6, 14. <https://doi.org/10.3390/jcdd6020014>
- Papademetriou, V., Farsang, C., Elmfeldt, D., Hofman, A., Lithell, H., Olofsson, B., Skoog, I., Trenkwalder, P., Zanchetti, A., 2004.

- Stroke prevention with the angiotensin II type 1-receptor blocker candesartan in elderly patients with isolated systolic hypertension: the Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE). *J. Am. Coll. Cardiol.* 44, 1175–1180. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.06.034>
- Patel, S., Rauf, A., Khan, H., Abu-Izneid, T., 2017. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed. Pharmacother.* 94, 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.091>
- Pavlatou, M.G., Mastorakos, G., Lekakis, I., Liatis, S., Vamvakou, G., Zoumakis, E., Papassotiriou, I., Rabavilas, A.D., Katsilambros, N., Chrousos, G.P., 2008. Chronic administration of an angiotensin II receptor antagonist resets the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and improves the affect of patients with diabetes mellitus type 2: Preliminary results. *Stress* 11, 62–72. <https://doi.org/10.1080/10253890701476621>
- Pechlivanova, D.M., Stoynev, A.G., Tchekalarova, J.D., 2011. The effects of chronic losartan pretreatment on restraint stress-induced changes in motor activity, nociception and pentylenetetrazol generalized seizures in rats. *Folia Med. (Plovdiv)*. 53, 69–73. <https://doi.org/10.2478/v10153-010-0040-z>
- Ranjbar, H., Aghaei, I., Moosazadeh, M., Shabani, M., 2018. Angiotensin II type 1 receptor blocker losartan attenuates locomotor, anxiety-like behavior, and passive avoidance learning deficits in a sub-chronic stress model. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 21, 856–862. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.27113.6632>
- Reinecke, A., Browning, M., Klein Breteler, J., Kappelmann, N., Ressler, K.J., Harmer, C.J., Craske, M.G., 2018. Angiotensin Regulation of Amygdala Response to Threat in High-Trait-Anxiety Individuals. *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging* 3, 826–835. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2018.05.007>
- Roy-Byrne, P.P., Davidson, K.W., Kessler, R.C., Asmundson, G.J.G., Goodwin, R.D., Kubzansky, L., Lydiard, R.B., Massie, M.J., Katon, W., Laden, S.K., Stein, M.B., 2008. Anxiety disorders and comorbid medical illness. *Gen. Hosp. Psychiatry* 30, 208–225. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2007.12.006>
- Saavedra, J.M., Ando, H., Armando, I., Baiardi, G., Bregonzio, C., Jezova, M., Zhou, J., 2004. Brain angiotensin II, an Important Stress Hormone: Regulatory Sites and Therapeutic Opportunities. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1018, 76–84. <https://doi.org/10.1196/annals.1296.009>
- Saavedra, J.M., Armando, I., Bregonzio, C., Juorio, A., Macova, M., Pavel, J., Sanchez-Lemus, E., 2006. A Centrally Acting, Anxiolytic Angiotensin II AT1 Receptor Antagonist Prevents the Isolation Stress-Induced Decrease in Cortical CRF1 Receptor and Benzodiazepine Binding. *Neuropsychopharmacology* 31, 1123–1134. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300921>
- Saavedra, J.M., Benicky, J., 2007. Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. *Stress* 10, 185–193. <https://doi.org/10.1080/10253890701350735>
- Saavedra, J.M., Pavel, J., 2005. Angiotensin II AT1 receptor antagonists inhibit the angiotensin-CRF-AVP axis and are potentially useful for the treatment of stress-related and mood disorders. *Drug Dev. Res.* 65, 237–269. <https://doi.org/10.1002/ddr.20027>
- Saavedra, J.M., Sánchez-Lemus, E., Benicky, J., 2011. Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. *Psychoneuroendocrinology* 36, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.10.001>
- Shad, M.U., 2020. Is there an association between

anxiety symptoms and valsartan treatment?  
 J. Affect. Disord. 261, 111–112.  
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.10.004>

018-9727-1

Tsutsumi, K., Saavedra, J.M., 1991.  
 Characterization and development of  
 angiotensin II receptor subtypes (AT1 and  
 AT2) in rat brain. Am. J. Physiol. Integr.  
 Comp. Physiol. 261, R209–R216.  
[https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.261.1.](https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.261.1.R209)  
 R209

Üresin, Y., Erbas, B., Özek, M., Özkök, E., Gürol,  
 A.O., 2004. Losartan may prevent the  
 elevation of plasma glucose, corticosterone  
 and catecholamine levels induced by  
 chronic stress. J. Renin-Angiotensin-  
 Aldosterone Syst. 5, 93–96.  
<https://doi.org/10.3317/jraas.2004.017>

Walf, A.A., Frye, C.A., 2007. The use of the  
 elevated plus maze as an assay of anxiety-  
 related behavior in rodents. Nat. Protoc. 2,  
 322–328.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>

Wang, L., Kloet, A.D. de, Pati, D., Hiller, H., Smith,  
 J.A., Pioquinto, D.J., Ludin, J.A., Oh, S.P.,  
 Katovich, M.J., Frazier, C.J., Raizada, M.K.,  
 Krause, E.G., 2016. Increasing brain  
 angiotensin converting enzyme 2 activity  
 decreases anxiety-like behavior in male  
 mice by activating central Mas receptors.  
 Neuropharmacology 105, 114–123.  
[https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.1](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.12.026)  
 2.026

Wincewicz, D., Braszko, J.J., 2017. Validation of  
 Brain Angiotensin System Blockade as a  
 Novel Drug Target in Pharmacological  
 Treatment of Neuropsychiatric Disorders.  
 Pharmacopsychiatry 50, 233–247.  
<https://doi.org/10.1055/s-0043-112345>

World Health Organization, 2017. Depression and  
 Other Common Mental Disorders: Global  
 Health Estimates. [https://doi.org/CC BY-](https://doi.org/CC-BY-NC-SA.3.0.IGO)  
 NC-SA 3.0 IGO

Yaribeygi, H., Sahraei, H., 2018.  
 Physiological/Neurophysiological  
 Mechanisms Involved in the Formation of  
 Stress Responses. Neurophysiology 50,  
 131–139. <https://doi.org/10.1007/s11062->

## 9

**ANEXO II – MATERIAL SUPLEMENTAR (ARTIGO)****THE ASSOCIATION BETWEEN THE RENIN-ANGIOTENSIN  
SYSTEM AND THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL  
AXIS IN ANXIETY DISORDERS: A SYSTEMATIC REVIEW  
OF ANIMAL STUDIES**

**Balthazar, L.; Lages, Y. V. M.; Romano, V. C.; Landeira-Fernandez, J.;  
Krahe, T. E.**

Department of Psychology, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro, Rio  
de Janeiro, Brazil.

**SUPPLEMENTARY MATERIAL**

## 1. SEARCH STRATEGY

**Table S1** – Search terms used on each databases.

Database	Search Terms	TOTAL
DLIN bMed	((Renin-Angiotensin System) OR (Renin Angiotensin System) OR (System, Renin-Angiotensin) OR (Renin-Angiotensin-Aldosterone System) OR (Renin Angiotensin Aldosterone System) OR (System, Renin-Angiotensin-Aldosterone) OR (RAS) OR (RAAS) OR (Angiotensin Renin System) OR (Kidney Pressor System) OR (Mechanism, Renin Angiotensin Aldosterone) OR (Renin Aldosterone System) OR (Renin Angiotensin Aldosterone Mechanism) OR (Renin Angiotensin Mechanism) OR (System, Renin Angiotensin) OR (System, Renin Angiotensin Aldosterone)) AND ((Hypothalamo-Hypophyseal System) OR (Hypothalamo Hypophyseal System) OR (Hypothalamic-Pituitary Unit) OR (Hypothalamic Pituitary Unit) OR (Hypophyseal Portal System) OR (Portal System, Hypophyseal) OR (Hypothalamic Hypophyseal System) OR (Hypothalamic Hypophyseal Systems) OR (Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis) OR (Hypothalamo Pituitary Adrenal Axis) OR (HPA axis) OR (HPA) OR (Hypothalamus Hypophysis Adrenal System) OR (Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis) OR (Hypothalamo Hypophyseal Adrenal Function) OR (Hypothalamo Hypophyseal Adrenal System) OR (Hypothalamo Hypophysial Adrenal System) OR (Hypothalamus Hypophysis Adrenal Axis)) AND ((Anxiety Disorders) OR (Anxiety Disorder) OR (Disorder, Anxiety) OR (Disorders, Anxiety) OR (Neuroses, Anxiety) OR (Anxiety Neuroses) OR (Anxiety States, Neurotic) OR (Anxiety State, Neurotic) OR (Neurotic Anxiety State) OR (Neurotic Anxiety States) OR (State, Neurotic Anxiety) OR (States, Neurotic Anxiety) OR (Anxiety) OR (Anxiety, Separation) OR (Separation Anxiety) OR (Separation Anxiety Disorder) OR (Anxiety Disorder, Separation) OR (Angst) OR (Nervousness) OR (Hypervigilance) OR (Anxiousness) OR (Social Anxiety) OR (Anxieties, Social) OR (Anxiety, Social) OR (Social Anxieties) OR (Mutism) OR (Mutisms) OR (Selective Mutism) OR (Mutism, Selective) OR (Mutism, Voluntary) OR (Mutisms, Voluntary) OR (Voluntary Mutism) OR (Voluntary Mutisms) OR (Mutism, Elective) OR (Elective Mutism) OR (Elective Mutisms) OR (Mutisms, Elective) OR (Mutism, Organic) OR (Mutisms, Organic) OR (Organic Mutism) OR (Organic Mutisms) OR (Kussmaul Aphasia) OR (Aphasia, Kussmaul) OR (Kussmauls Aphasia) OR (Aphasia, Kussmauls) OR (Kussmauls Aphasia) OR (Mutism, Conversion) OR (Conversion Mutism) OR (Conversion Mutisms) OR (Mutisms, Conversion) OR (Panic Disorder) OR (Disorder, Panic) OR (Disorders, Panic) OR (Panic Disorders) OR (Panic Attacks) OR (Attack, Panic) OR (Attacks, Panic) OR (Panic Attack) OR (Agoraphobia) OR (Agoraphobias) OR (Agoraphobic Anxiety) OR (Agoraphobic Fear) OR (Phobia, Agora) OR (Generalized Anxiety Disorder) OR (GAD))	16

**Embase**

("Renin-Angiotensin System" OR "Renin Angiotensin System" OR "System, Renin-Angiotensin" OR "Renin-Angiotensin-Aldosterone System" OR "Renin Angiotensin Aldosterone System" OR "System, Renin-Angiotensin-Aldosterone" OR "RAS" OR "RAAS" OR "Angiotensin Renin System" OR "Kidney Pressor System" OR "Mechanism, Renin Angiotensin Aldosterone" OR "Renin Aldosterone System" OR "Renin Angiotensin Aldosterone Mechanism" OR "Renin Angiotensin Mechanism" OR "System, Renin Angiotensin" OR "System, Renin Angiotensin Aldosterone") AND ("Hypothalamo-Hypophyseal System" OR "Hypothalamo Hypophyseal System" OR "Hypothalamic-Pituitary Unit" OR "Hypothalamic Pituitary Unit" OR "Hypophyseal Portal System" OR "Portal System, Hypophyseal" OR "Hypothalamic Hypophyseal System" OR "Hypothalamic Hypophyseal Systems" OR "Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis" OR "Hypothalamo Pituitary Adrenal Axis" OR "HPA axis" OR "HPA" OR "Hypothalamus Hypophysis Adrenal System" OR "Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis" OR "Hypothalamo Hypophyseal Adrenal Function" OR "Hypothalamo Hypophyseal Adrenal System" OR "Hypothalamo Hypophysial Adrenal System" OR "Hypothalamus Hypophysis Adrenal Axis") AND ("Anxiety Disorders" OR "Anxiety Disorder" OR "Disorder, Anxiety" OR "Disorders, Anxiety" OR "Neuroses, Anxiety" OR "Anxiety Neuroses" OR "Anxiety States, Neurotic" OR "Anxiety State, Neurotic" OR "Neurotic Anxiety State" OR "Neurotic Anxiety States" OR "State, Neurotic Anxiety" OR "States, Neurotic Anxiety" OR "Anxiety" OR "Anxiety, Separation" OR "Separation Anxiety" OR "Separation Anxiety Disorder" OR "Anxiety Disorder, Separation" OR "Angst" OR "Nervousness" OR "Hypervigilance" OR "Anxiousness" OR "Social Anxiety" OR "Anxieties, Social" OR "Anxiety, Social" OR "Social Anxieties" OR "Mutism" OR "Mutisms" OR "Selective Mutism" OR "Mutism, Selective" OR "Mutism, Voluntary" OR "Mutisms, Voluntary" OR "Voluntary Mutism" OR "Voluntary Mutisms" OR "Mutism, Elective" OR "Elective Mutism" OR "Elective Mutisms" OR "Mutisms, Elective" OR "Mutism, Organic" OR "Mutisms, Organic" OR "Organic Mutism" OR "Organic Mutisms" OR "Kussmaul Aphasia" OR "Aphasia, Kussmaul" OR "Kussmauls Aphasia" OR "Aphasia, Kussmauls" OR "Kussmauls Aphasia" OR "Mutism, Conversion" OR "Conversion Mutism" OR "Conversion Mutisms" OR "Mutisms, Conversion" OR "Panic Disorder" OR "Disorder, Panic" OR "Disorders, Panic" OR "Panic Disorders" OR "Panic Attacks" OR "Attack, Panic" OR "Attacks, Panic" OR "Panic Attack" OR "Agoraphobia" OR "Agoraphobias" OR "Agoraphobic Anxiety" OR "Agoraphobic Fear" OR "Phobia, Agora" OR "Generalized Anxiety Disorder" OR "GAD")

**35****Web of Science \***

TS=("Renin-Angiotensin System" OR "Renin Angiotensin System" OR "System, Renin-Angiotensin" OR "Renin-Angiotensin-Aldosterone System" OR "Renin Angiotensin Aldosterone System" OR "System, Renin-Angiotensin-Aldosterone" OR "RAS" OR "RAAS" OR "Angiotensin Renin System" OR "Kidney Pressor System" OR "Mechanism, Renin Angiotensin Aldosterone" OR "Renin Aldosterone System" OR "Renin Angiotensin Aldosterone Mechanism" OR "Renin Angiotensin Mechanism" OR "System, Renin Angiotensin" OR "System, Renin Angiotensin Aldosterone") AND TS=("Hypothalamo-Hypophyseal System" OR "Hypothalamo Hypophyseal System" OR "Hypothalamic-Pituitary Unit" OR "Hypothalamic Pituitary Unit" OR "Hypophyseal Portal System" OR "Portal System, Hypophyseal" OR "Hypothalamic Hypophyseal System" OR "Hypothalamic Hypophyseal Systems" OR "Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis" OR "Hypothalamo Pituitary Adrenal Axis" OR "HPA axis" OR "HPA" OR "Hypothalamus Hypophysis Adrenal System" OR "Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis" OR "Hypothalamo Hypophyseal Adrenal Function" OR "Hypothalamo Hypophyseal Adrenal System" OR "Hypothalamo Hypophysial Adrenal System" OR "Hypothalamus Hypophysis Adrenal Axis") AND TS=("Anxiety Disorders" OR "Anxiety Disorder" OR "Disorder, Anxiety" OR "Disorders, Anxiety" OR "Neuroses, Anxiety" OR "Anxiety Neuroses" OR "Anxiety States, Neurotic" OR "Anxiety State, Neurotic" OR "Neurotic Anxiety State" OR "Neurotic Anxiety States" OR "State, Neurotic Anxiety" OR "States, Neurotic Anxiety" OR "Anxiety" OR "Anxiety, Separation" OR "Separation Anxiety" OR "Separation Anxiety Disorder" OR "Anxiety Disorder, Separation" OR "Angst" OR "Nervousness" OR "Hypervigilance" OR "Anxiousness" OR "Social Anxiety" OR "Anxieties, Social" OR "Anxiety, Social" OR "Social Anxieties" OR "Mutism" OR "Mutisms" OR "Selective Mutism" OR "Mutism, Selective" OR "Mutism, Voluntary" OR "Mutisms, Voluntary" OR "Voluntary Mutism" OR "Voluntary Mutisms" OR "Mutism, Elective" OR "Elective Mutism" OR "Elective Mutisms" OR "Mutisms, Elective" OR "Mutism, Organic" OR "Mutisms, Organic" OR "Organic Mutism" OR "Organic Mutisms" OR "Kussmaul Aphasia" OR "Aphasia, Kussmaul" OR "Kussmauls Aphasia" OR "Aphasia, Kussmauls" OR "Kussmauls Aphasia" OR "Mutism, Conversion" OR "Conversion Mutism" OR "Conversion Mutisms" OR "Mutisms, Conversion" OR "Panic Disorder" OR "Disorder, Panic" OR "Disorders, Panic" OR "Panic Disorders" OR "Panic Attacks" OR "Attack, Panic" OR "Attacks, Panic" OR "Panic Attack" OR "Agoraphobia" OR "Agoraphobias" OR "Agoraphobic Anxiety" OR "Agoraphobic Fear" OR "Phobia, Agora" OR "Generalized Anxiety Disorder" OR "GAD")

**12**

\* the category "TS" (topic) was used since there is a maximum of 50 terms on the data search to the category "ALL".

## 2. QUALITY OF EVIDENCE

**T** **le S2** – Evaluation of the risk of bias by ten categories, based on SYRCLE (Hooijmans et al., 2014).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1912268/CA		Edwards, <i>et al.</i> (1999)	Armando, <i>et al.</i> (2001)	Saavedra, <i>et al.</i> (2006)	Hlavacova & Jezova (2008a)	Hlavacova & Jezova (2008b)	de Kloet, <i>et al.</i> (2017)	Aswar, <i>et al.</i> (2017)	de Kloet, <i>et al.</i> (2020)
	Was the allocation sequence adequately generated and applied?								
	Did the investigators describe a random process in the sequence generation process?	Y	N	N	Y	Y	N	N	N
	Were the groups similar at baseline or were they adjusted for confounders in the analysis?								
	Was the distribution of relevant baseline characteristics balanced for the intervention and control groups?	Y	Y	Y	Y	Y	U	Y	Y
	If relevant, did the investigators adequately adjust for unequal distribution of some relevant baseline characteristics in the analysis?	U	U	U	U	U	U	U	Y
	Was the timing of treatment initiation adequate?	N/A	Y	Y	Y	Y	N/A	Y	N/A
	Was the allocation to the different groups adequately concealed during?								
	Could the investigator allocating the animals to intervention or control group not foresee assignment?	U	U	U	U	U	U	U	U

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1912268/CA	Were the animals randomly housed during the experiment?								
	Did the authors randomly place the cages or animals within the animal rooms/facility?	U	U	U	U	U	U	U	
	Was it unlikely that the outcome or the outcome measurement was influenced by not randomly housing the animals?	U	U	U	U	U	U	U	
	Were the caregivers and/or investigators blinded from knowledge of which intervention the animal received during the experiment?								
	Was blinding of caregivers and investigators ensured, and was it unlikely that their binding could have been broken?	U	U	U	U	U	Y	U	
	Were the animals selected at random for outcome assessment?								
	Did the investigators randomly pick an animal during outcome assessment, or did they use a random component in the sequence generation for outcome assessment?	U	U	U	U	U	Y	N	U
	Was the outcome assessor blinded?								
	Was blinding of the outcome assessor ensured, and it was unlikely that blinding could have been broken?	U	U	U	U	U	U	Y	U
	Was the outcome assessor not blinded, but do review authors judge that the outcome is not likely to be influenced by lack of blinding?	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Were incomplete outcome data adequately addressed?									



PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1912268/CA	Were all animals included in the analysis?	Y	Y	Y	Y	Y	U	Y	Y
	Were the reasons for missing outcome data unlikely to be related to true outcome? (e.g. technical failure)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	U	N/A	N/A
	Were missing outcome data balanced in numbers across intervention groups, with similar reasons for missing data across groups?	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	U	N/A	N/A
	Are missing outcome data imputed using appropriate methods?	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N	N/A	N/A
	Are reports of the study free of selective outcome reporting?								
	Was the study protocol available and were all of the study's pre-specified primary and secondary outcomes reported in the current manuscript?	U	U	U	U	U	U	U	U
	Was the study protocol not available, but was it clear that the published report included all expected outcomes (i.e. comparing methods and results section)?	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	<b>Was the study apparently free of other problems that could result in a high risk of bias?</b>	N	Y	Y	Y	Y	N	N	Y
	If not, describe:	The study mentions using both sexes but doesn't clarify how many males and females were used for each experiment.					The number of animals used in each group and experiment is not clear.	The study mentions using both sexes but doesn't clarify how many males and females were used for each experiment.	

**Y** = yes (low risk of bias); **N** = no (high risk of bias); **U** = unclear (unclear risk of bias – if there are insufficient data to assess the risk of bias properly); **N/A** = not applicable or not available.

Hooijmans, C.R., Rovers, M.M., de Vries, R.B., Leenaars, M., Ritskes-Hoitinga, M., Langendam, M.W., 2014. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. BMC Med. Res. Methodol. 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>